

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Determinantes moleculares implicados en la
resistencia a análogos a timidina y en la fidelidad
de copia de la retrotranscriptasa del virus de la
inmunodeficiencia humana tipo 1**

TESIS DOCTORAL

Tania Matamoros Grande

Madrid, 2008

Memoria presentada por la Lda. en Bioquímica Tania Matamoros Grande para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Enero, 2008.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M.), bajo la dirección del Dr. Luis Menéndez Arias, con financiación por parte de la Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) (beca asociada al proyecto 36207/01) y del Ministerio de Educación y Ciencia (beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) asociada al proyecto BIO2003-01175)

A mis padres

A Álvaro

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de Tesis, el Dr. Luis Menéndez Arias, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en un laboratorio de tan alto nivel científico y por las muchas horas de dedicación y constante apoyo que me ha ofrecido a lo largo de estos años.

Gracias a mis compañeras de grupo y de tema, las que estuvieron Clara y Magda (muuuuuuy bien!, eres estupenda), y a las que están, mis compis del 124: Moni (churra! gracias por esas risas) y Mar (gracias por hacer que el nuevo edificio no sea tan frío, aunque estemos en el polo!!).

Gracias a todo el 303, porque durante cinco años ha sido y seguirá siendo siempre mi LABO. Gracias a los que ya se fueron (Ana Grande, Claudia, Gema, Juanillo, Maca, Moni H. y Nonia) y a los que siguen (Anita, Armando, Celia, Héctor, Martita, Mercedes, Noemí, Ru, Samuel y Vero) gracias a todas vosotras por hacer taaaan fácil ir a trabajar cada mañana, por todas esas fantásticas sobremesas y cotilleos. Por haberme ayudado tanto y no sólo en los experimentos. Estos años han sido maravillosos!. Gracias al Dr. Esteban Domingo y a la Dra. Cristina Escarmís porque, aunque “oficialmente” no he formado parte de su grupo, me han hecho sentir siempre parte de este gran laboratorio. Gracias por todo lo que he aprendido.

Gracias a Mila (no cambies nunca!), Rebeca B., Vero (Colombia!), Isabela (que de cigarritos juntas), Jesús (enhorabuena!), Rudi, Raqs, Jaime, Alí, Carolina, Martín, Pablito (ese arte con faralaes!!), Gloria (por esos momentos bailongos) y Carola (mi farmacéutica particular). Gracias a todos los Juegueros por todos esos jueves de Melo's, entre riveiros y pimientos, y todas esas risas...espero que siga habiendo muchos juegos más. Gracias a todas porque conocer gente como vosotras es una de las cosas por las que merece la pena trabajar en el CBM. Gracias a toda la gente del CBM que de alguna manera me ha hecho más fácil estos casi seis años de Tesis...en especial a la gente de Instrumentación por su gran ayuda y por su buen humor.

Gracias a Baek y a todo su laboratorio y en especial a Diana y a José por hacer que mi estancia en Rochester fuera una experiencia estupenda.

Gracias a mis pimpis: Anita, Celia y Vero, ¿por qué? por TODO...por haber estado a mi lado en mis mejores momentos y sobre todo por haber estado en los peores. Porque sois geniales y sin vosotras esto no hubiera sido lo mismo. At di en of de mon!!

Gracias a todos mis colegas leganenses (sois demasiados para nombraros a todos) por todos estos años compartiendo tantas cosas (...que viejos que somos ya!) y por no dejar de luchar ni un minuto. Gracias a toda la gente que de una u otra manera lucha a diario porque esto cambie.

Gracias a mis niñas: Isa, Isamari, Sandra y La Tere porque sois fantásticas y porque sois mis amigas del alma y me habéis demostrado que a pesar de la distancia y del paso del tiempo la amistad de verdad no se acaba. Tere, gracias por tu sonrisa.

Gracias Bea. Julia y Paulino, por apoyarme tanto y hacerme sentir parte de vuestra gran familia. Gracias a la familia Barrio por todas esas cenas caóticas de nochevieja que me gustan tanto.

Gracias a mi estupenda family, a mis abuelitas (las tres) que son las más guapas, a mis tíos favoritos (Coquito y Nanón), a Bego, a Carmen, a mi primo Héctor (gracias por sacarme de pobre cuando seas el futuro Gasol, jeje), y a mis primos los peques Miguelito, Rodri y Amaranta que son los niños más listos del mundo. Gracias a todos porque aunque sea el peor día del mundo cuando estoy con vosotros estoy feliz. Gracias a mi hermanita por su gran aportación a esta Tesis, por ser una artista!!, y por todos esos buenos ratos que hemos pasado juntas. Gracias a mi familia Navarreisqueña que aunque les vea de Pascuas a Ramos parece que los ví el día anterior. Os quiero mucho a todos.

Gracias a mis papis, por ser los mejores del mundo, porque gracias a ellos, a su cariño, su apoyo y educación he llegado hasta aquí. Esta tesis es para vosotros, porque sin vosotros no habría sido posible.

Gracias Álvaro por ser como eres. Gracias por formar parte del argumento de mi vida. Gracias Compañero!.

“¡Triste época la nuestra!
Es más fácil desintegrar un
átomo que un prejuicio”.
Albert Einstein

ABREVIATURAS

AMV	Virus de la mieloblastosis de aves
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AppNHp	Adenosina-5'-[(β - γ)- imino]-trifosfato
APS	Adenosina-5'-O-fosfosulfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATP γ S	Adenosina-5'-(γ -tio)-trifosfato
AZT	3'-azido-3'-desoxitimidina, zidovudina
AZTMP	3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-monofosfato
AZTTP	3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-trifosfato
AZTTP α S	3'-azido-3'-desoxitimidin-5'-O-(1-tio)-trifosfato
Be ²⁺	Berilio (catión)
BSA	Seroalbúmina bovina
CA	Proteína de la cápsida (p24, en el VIH-1)
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-didesoxicitidina-5'-trifosfato
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
ddC	2',3'-didesoxicitidina, zalcitabina
ddI	2',3'-didesoxiinosina, didanosina
ddNTP	2',3'-didesoxinucleósido-5'-trifosfato
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina-5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d4T	3'-desoxi-2',3'-dideshidrotimidina, estavudina
d4TMP	3'-desoxi-2',3'-dideshidrotimidina-5'-monofosfato
d4TTP	3'-desoxi-2',3'-dideshidrotimidina-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacetato sódico
IN	Integrasa
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactopiranósido
<i>lacZ</i>	Gen que codifica para β -galactosidasa
LTRs	"Long terminal repeat", zonas terminales repetidas
MA	Proteína de la matriz (p17, en el VIH-1)

Mg ²⁺	Magnesio (catión)
Mn ²⁺	Manganeso (catión)
Mo-MLV	Virus Moloney de la leucemia de ratón
NC	Proteína de la nucleocápsida (p7, en el VIH-1)
NNRTI	Inhibidor de la RT no análogo a nucleósido
NRTI	Inhibidor de la RT análogo a nucleósido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPi	Pirofosfato
PR	Proteasa viral
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNasa H	Ribonucleasa H
RT	Retrotranscriptasa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SU	Glicoproteína de superficie (gp120, en el VIH-1)
3TC	2'-desoxi-3'-tiacitidina, lamivudina
TM	Glicoproteína transmembranal (gp41, en el VIH-1)
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
WT	Tipo silvestre
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

NOMENCLATURA DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

A (Ala) Alanina	M (Met) Metionina
C (Cys) Cisteína	N (Asn) Asparagina
D (Asp) Ácido aspártico	P (Pro) Prolina
E (Glu) Ácido glutámico	Q (Gln) Glutamina
F (Phe) Fenilalanina	R (Arg) Arginina
G (Gly) Glicina	S (Ser) Serina
H (His) Histidina	T (Thr) Treonina
I (Ile) Isoleucina	V (Val) Valina
K (Lys) Lisina	W (Trp) Triptófano
L (Leu) Leucina	Y (Tyr) Tirosina

ÍNDICE

	Página
SUMMARY (RESUMEN EN INGLÉS)	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana	3
1.2 La RT del VIH-1	7
1.2.1 Características y función	7
1.2.2 Motivos conservados en las DNA y RNA polimerasas	8
1.2.3 Estructura de la RT	9
1.2.4 Residuos importantes para la actividad DNA polimerasa de la RT	11
1.2.5 Tratamiento antirretroviral	14
1.2.5.1 Inhibidores análogos a nucleósido	16
1.2.5.2 Inhibidores no análogos a nucleósido	24
1.3 Fidelidad de copia de la RT del VIH-1	25
1.3.1 Tipos de ensayos de fidelidad	26
1.3.1.1 Ensayos basados en una única ronda de replicación	26
1.3.1.2 Ensayos bioquímicos	27
1.3.1.3 Ensayos genéticos	29
1.3.2 Fidelidad de copia de mutantes de la RT del VIH-1	31
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Clonación de la región codificante de las RTs BH10 y SS en el plásmido pRT66B	38
3.2 Mutagénesis dirigida	39
3.3 Purificación de retrotranscriptasas	43
3.3.1 Purificación mediante expresión individual de las dos subunidades de la RT	44

3.3.1.1 Expresión de las subunidades p66 y p51 de la RT	44
3.3.1.2 Lisis de las bacterias y formación del heterodímero	44
3.3.1.3 Cromatografía de afinidad	45
3.3.1.4 Cromatografía de intercambio iónico	45
3.3.1.5 Comprobación de la pureza y la concentración de la enzima obtenida	46
3.3.2 Purificación de RTs mediante la expresión de la subunidad p66 y su posterior procesamiento	46
3.3.2.1 Expresión de la subunidad p66 de la RT	46
3.3.2.2 Lisis de las bacterias	47
3.3.2.3 Cromatografía de intercambio iónico	47
3.3.2.4 Cromatografía de afinidad	47
3.3.2.5 Comprobación de la pureza y la concentración de la enzima obtenida	48
3.4 Preparación de complejos DNA/DNA heteropoliméricos	48
3.5 Determinación de la concentración de enzima activa	50
3.6 Ensayos de bloqueo con inhibidores y posterior escisión y polimerización	51
3.7 Ensayos de retardo en gel	52
3.7.1 Bloqueo del iniciador con d4T-trifosfato (d4TTP)	52
3.7.2 Determinación de la afinidad de la RT por el complejo molde-iniciador bloqueado en el extremo 3' con d4T	53
3.7.3 Formación del complejo ternario estable y determinación de la afinidad de unión del dNTP ($K_{d[dNTP]}$ aparente)	54
3.8 Ensayos de extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP	55
3.9 Ensayos cinéticos para la determinación de la fidelidad de copia	56
3.9.1 Ensayos cinéticos en el estado estacionario	56
3.9.1.1 Incorporación de dNTPs correctos e incorrectos	56
3.9.1.2 Elongación de extremos desapareados	57
3.9.2 Ensayos cinéticos en el estado pre-estacionario	58
3.9.2.1 Incorporación de dNTPs correctos	58
3.9.2.2 Incorporación de dNTPs incorrectos	59

3.9.2.3 Elongación de extremos desapareados	60
3.10 Ensayos genéticos para la determinación de la fidelidad de copia	61
3.10.1 Construcción del molde de DNA	61
3.10.2 Reacción de síntesis de DNA	62
3.10.3 Preparación de células electrocompetentes	62
3.10.4 Electroporación y plaqueo	62
3.10.5 Análisis de los mutantes	63
4. RESULTADOS	66
4.1 Papel de la Tyr-215 y del Asp-67 en el mecanismo molecular de resistencia a NRTIs de RTs del VIH-1 portadoras de una inserción en el subdominio “fingers”	66
4.1.1 Mutaciones de resistencia en la RT del VIH-1 asociadas a inserciones en el subdominio “fingers”	66
4.1.2 Escisión de AZT-monofosfato (AZTTP y d4T-monofosfato (d4TTP) de iniciadores de DNA bloqueados	68
4.1.3 Inhibición de la reacción de escisión por el siguiente nucleótido complementario	70
4.1.4 Formación de complejos ternarios estables	72
4.2 Estudio de inhibidores potenciales de la reacción de escisión	76
4.2.1 Efecto de análogos de timidina modificados en su fosfato α sobre el mecanismo de resistencia a NRTIs de una RT del VIH-1, resistente a múltiples inhibidores	76
4.2.1.1 Derivados α -borano de NRTIs	76
4.2.1.1.1 <i>Reacción de escisión mediada por ATP de iniciadores bloqueados con derivados α-borano de AZTTP</i>	77
4.2.1.1.2 <i>Reacción de escisión mediada por ATP de iniciadores bloqueados con derivados α-borano de d4TTP</i>	80
4.2.1.1.3 <i>Inhibición de la escisión de derivados α-borano de AZTTP y d4TTP</i>	81
4.2.1.2 Tioderivados de AZTTP	82
4.2.2 Efecto de distintos donadores de PPi sobre el mecanismo de escisión de NRTIs	84

4.3 Análisis del efecto de mutaciones en la posición sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1	86
4.3.1 Efecto de la sustitución de la Val-75 sobre la actividad polimerasa de la RT del VIH-1	88
4.3.2 Extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP	89
4.3.2.1 Efecto de Be^{2+} y Mn^{2+} sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1	92
4.3.3 Determinación de la fidelidad de copia de DNA en el estado estacionario	94
4.3.3.1 Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos	95
4.3.3.2 Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados	96
4.3.4 Determinación de la fidelidad de copia de DNA en el estado pre-estacionario	96
4.3.4.1 Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos	98
4.3.4.2 Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados	100
4.3.5 Fidelidad de copia de DNA analizada mediante ensayos genéticos	105

5. DISCUSIÓN **108**

5.1 Determinantes moleculares de la resistencia a NRTIs en RTs portadoras de inserciones en el subdominio “fingers”	108
5.1.1 Influencia de la Tyr-215 en la actividad fosforolítica de la RT SS	109
5.1.2 Los dNTPs son capaces de inhibir la reacción de escisión responsable de la resistencia a inhibidores de la RT análogos a timidina	111
5.1.3 Localización estructural de la Tyr-215 y de la inserción Ser-Ser en la RT del VIH-1: Implicaciones en resistencia	114
5.1.4 Patrones de mutaciones encontradas <i>in vivo</i> y su correlación con los datos bioquímicos	115
5.2 Búsqueda de nuevas estrategias para la inhibición de la reacción de escisión, responsables de la resistencia a inhibidores de la RT análogos a timidina en cepas multirresistentes del VIH-1	117
5.2.1 Efecto de las modificaciones en los fosfatos del donador de PPi sobre la reacción de escisión	117
5.2.2 Introducción de un grupo borano en el fosfato α de NRTIs y su impacto en la actividad fosforolítica de RTs multirresistentes	117

5.2.3 Introducción de un azufre en el fosfato α de NRTIs y su impacto en la actividad fosforolítica de RTs multirresistentes	121
5.3 Fidelidad de RTs portadoras de cambios en la posición 75	122
6. CONCLUSIONES	130
7. BIBLIOGRAFÍA	132
8. PUBLICACIONES	159

Summary

SUMMARY (Resumen en inglés)

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) is a multifunctional enzyme with RNA- and DNA-dependent DNA polymerase, RNase H, strand transfer and strand displacement activities. HIV-1 RT is a heterodimer enzyme composed of two subunits, p66 and p51. Reverse transcription is error prone and contributes to the high genetic variability of retroviruses. One of the consequences of the high mutation rates has been the emergence of drug-resistant HIV variants. With the increasing complexity of the antiretroviral regimens, novel mutational patterns conferring high-level resistance to nucleoside RT inhibitors have been identified in viral isolates, among them, insertions in the β 3- β 4 hairpin-loop of HIV-1 RT. The combination of a dipeptide insertion and thymidine analogues mutations in the RT confers an ATP-dependent phosphorolytic activity that facilitates the removal of the inhibitor from primers terminated with AZT or d4T. One of the objectives of this Thesis has been the identification of molecular determinants involved in the excision activity of HIV-1 RT containing a dipeptide insertion in the β 3- β 4 hairpin loop. The β 3- β 4 hairpin loop plays an important role in nucleoside analogue resistance, and modulates the RT fidelity because of its interactions with the template-primer. We have studied the role of Val-75 in fidelity of DNA synthesis under steady-state and pre-steady-state conditions and using M13 *lacZ α* genetic assays.

In this Doctoral Thesis we report that substituting Thr, Ser, or Asn for Tyr-215 in a multidrug-resistant RT, bearing a Ser-Ser insertion between codons 69 and 70, leads to AZT and d4T resensitization through the loss of the ATP-mediated removal activity. The results suggest that Tyr-215 is involved in the effective positioning of the PP_i donor for the catalytic attack of the terminated primer. We also show that oxygen atoms bound to the γ phosphate group of nucleoside triphosphates are important for the efficiency of the excision reaction. Furthermore, the blocked primer after incorporation of an α -phosphorothioate derivative of AZT becomes resistant to excision by insertion-containing RTs, which contain high levels of excision activity. These results suggest that phosphorothioate derivatives of currently approved drugs could be useful against excision-proficient HIV-1 RTs. Finally, we report that the fidelity of RTs bearing mutations V75F and V75I increased 1.8- and 3-fold, respectively, as measured by the M13 *lacZ α* forward mutation assay, while V75A showed 1.4-fold decreased accuracy. Steady- and pre-steady state kinetics demonstrated that the increased fidelity of V75I and V75F was related to their decreased ability to extend mismatched template–primers, while misincorporation efficiencies were not significantly affected by mutations. Altogether, these data suggest that Val-75 is an important determinant of fidelity in HIV-1 RT.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

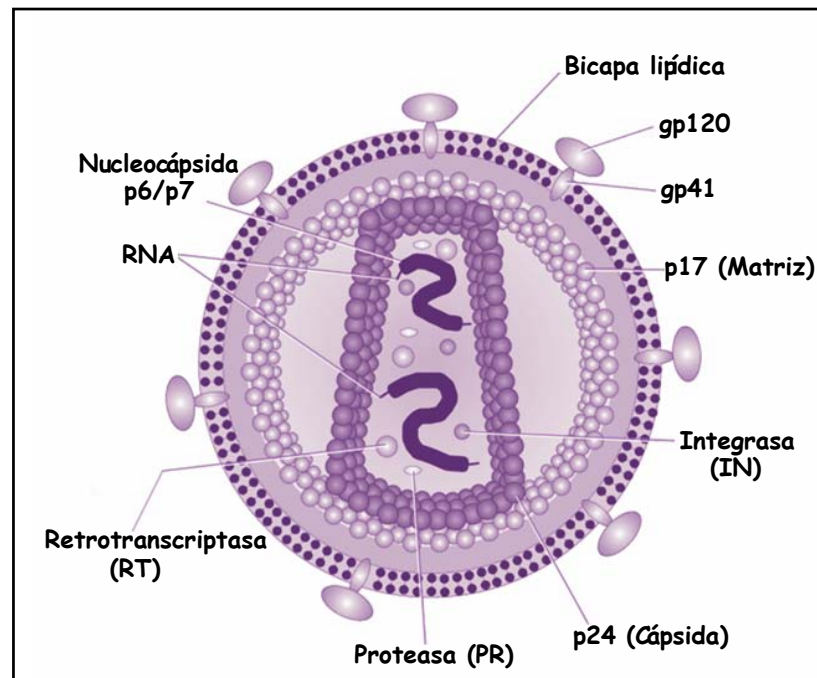
1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue identificado como el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984). El VIH pertenece al género *Lentivirinae*, dentro de la familia *Retroviridae*. Esta familia está constituida por virus animales cuyo material genético se encuentra en forma de ácido ribonucleico (RNA) monocatenario. Tras la infección de la célula, el RNA genómico se convierte en ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena, que posteriormente se integra en el genoma celular (Baltimore, 1970; Temin y Mizutani, 1970).

Como todos los retrovirus, el VIH está rodeado de una envuelta lipídica derivada de la membrana de la célula hospedadora. En esta envuelta se encuentra expuesta hacia el exterior la glicoproteína de superficie (SU, gp120), anclada al virus a través de interacciones con la glicoproteína transmembranal (TM, gp41). El interior viral está formado por la proteína de la matriz (MA, p17) y en el centro se localiza una cápsida cónica formada por la proteína CA (p24). La cápsida contiene dos copias del genoma viral, compuesto por dos hebras de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que se encuentran formando parte de un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína de la nucleocápsida (NC, p7). En la cápsida también se encuentran tres enzimas esenciales para la replicación del virus: la retrotranscriptasa (RT, p66/p51), responsable de catalizar la transcripción del RNA viral a DNA de doble cadena (DNA proviral); la proteasa (PR, p11), responsable del procesamiento proteolítico de los precursores Gag y Gag-Pol; y la integrasa (IN, p32), responsable de la inserción del DNA proviral en el genoma de la célula hospedadora. En el virión también pueden empaquetarse proteínas accesorias como Nef, Vif y Vpr. Otras proteínas accesorias del virus tales como Rev, Tat y Vpu, funcionan cuando el virus ha infectado la célula y no parecen estar empaquetadas dentro del virión (Figura 1A) (revisado en: Turner y Summers, 1999; Adamson y Freed, 2007).

El genoma del VIH tipo 1 (VIH-1), de un tamaño aproximado de 9,8 Kb, se encuentra flanqueado en sus extremos 3' y 5' por dos extremos repetitivos largos o LTRs ("long terminal repeats"), formados por las regiones U3 ("unique" 3'), R ("repeat") y U5 ("unique" 5'), responsables del inicio de la transcripción y de la poliadenilación del

A



B

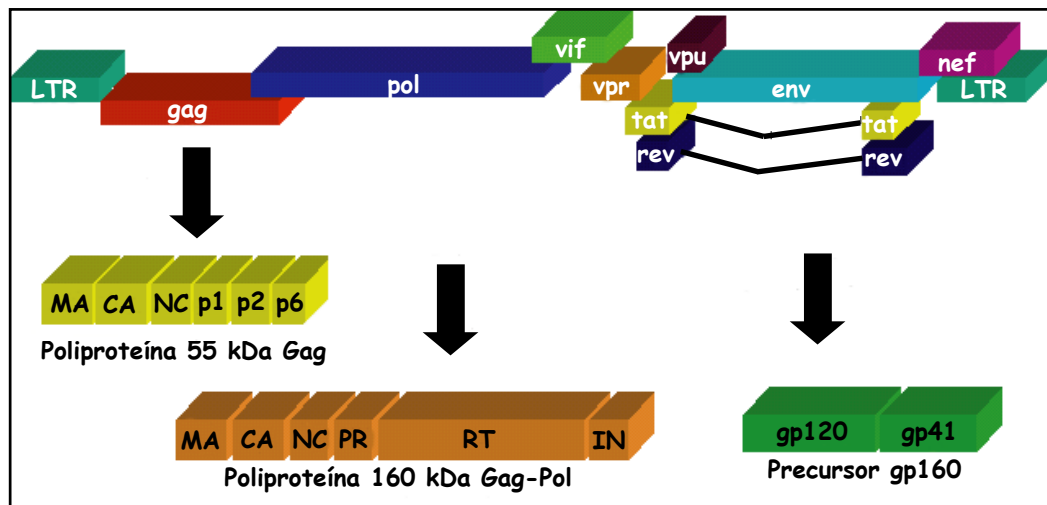


Figura 1. (A) Representación de la partícula del VIH-1. Se indica la localización de algunas de las proteínas en el virión (figura adaptada de un dibujo de Daniel Beyer, <http://es.wikipedia.org/wiki/imagen:VIH-virión.png>). **(B) Representación esquemática del genoma del VIH-1, su procesamiento y sus productos proteicos.** En ambos extremos se muestran las zonas correspondientes a las secuencias repetidas largas (LTR), además de los genes *gag*, *pol* y *env*, que codifican las proteínas esenciales del virus, y los genes que codifican las proteínas reguladoras y accesorias. También se representan los productos de la expresión de los genes *gag*, *pol* y *env*, así como las proteínas a las que dan lugar después del procesamiento llevado a cabo por la proteasa viral y las proteasas celulares.

RNA mensajero viral (RNAm) (García y Gaynor, 1994; Jones y Peterlin, 1994; Gee *et al.*, 2006). Presenta tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), además de tres genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*) y tres accesorios denominados *vif*, *vpr* y *vpu*. El genoma viral contiene 9 marcos de lectura abiertos. Tres de ellos codifican para las

poliproteínas Gag, Pol y Env, comunes a todos los retrovirus, y que se procesan proteolíticamente para dar lugar a las proteínas que forman el virus maduro ([Figura 1B](#)). Las dos glicoproteínas de la envuelta [es decir, la proteína de superficie, gp120 (SU) y la proteína transmembranal, gp41 (TM)], codificadas por el gen *env*, se originan a partir de un mismo precursor de 160 kDa (gp160), que tras una serie de etapas de glicosilación, es procesado por proteasas celulares (revisado en [Prabakaran et al., 2007](#)). El gen *gag* se traduce como un precursor poliproteico de 55 kDa, y su procesamiento posterior por la PR viral da lugar a las proteínas MA, CA, NC y p6, y a dos péptidos espaciadores (p1 y p2). El gen *pol* se expresa como una proteína de fusión Gag-Pol, que se genera por un mecanismo de cambio en la fase de lectura. Este fenómeno implica que la señal de terminación del gen *gag* no sea reconocida por el ribosoma, y éste continúe la traducción hasta expresar la poliproteína Gag-Pol, que contiene los productos de traducción de *gag* y de *pol*. Este hecho se da con una frecuencia del 5%, por lo que los productos del gen *pol* están en una proporción aproximada de 1:20 con respecto a los del gen *gag* ([Jacks et al., 1988](#); [Wilson et al., 1988](#)). El precursor Gag-Pol se procesa dando lugar a proteínas estructurales del virus y a las enzimas virales PR, RT e IN ([Figura 1B](#)).

En la [Figura 2](#) se muestran las etapas principales del ciclo de replicación del VIH. El ciclo comienza con el reconocimiento de la célula diana mediante interacciones entre la gp120 viral y el receptor específico del virus, la proteína CD4 ([Dalglish et al., 1984](#); [Klatzmann et al., 1984](#)). También están implicados en el reconocimiento y entrada del virus correceptores como CXCR4 y CCR5, que pertenecen a la familia de los receptores de quimioquinas ([Feng et al., 1996](#); [Dragic et al., 1996](#); revisado en [Arenzana-Seisdedos y Parmentier, 2006](#)). Una vez que se ha producido la interacción de la gp120 con los receptores, la gp41 media el proceso de fusión de la envuelta del virus con la membrana celular de la célula hospedadora. Tras un proceso poco conocido que implica la pérdida de la envuelta y de la cápsida viral, se produce la retrotranscripción, catalizada en el citosol por la RT. Una vez sintetizado el DNA viral de doble cadena, éste se transporta al núcleo formando parte de un complejo de preintegración, cuya composición no se conoce bien, pero que incluiría las proteínas IN, MA, RT, Vpr y probablemente NC. Vpr sería la responsable de dirigir este complejo hasta el núcleo ([Fouchier et al., 1997](#); [Nie et al., 1998](#); [Rücker et al., 2004](#); revisado en [Zhao et al., 2007](#)). A continuación se produce la integración del DNA viral en el genoma de la célula hospedadora por la actividad catalítica de la IN. Después de que el DNA proviral ha sido integrado al genoma celular, el virus permanece en un estado

latente. Los fenómenos de reactivación y replicación requieren de la activación de la célula hospedadora a través de varios factores como antígenos, mitógenos y citoquinas, entre otros (Shaw *et al.*, 1988; Laughlin y Pomerantz, 1994; revisado en Quivy *et al.*, 2007). Los RNAs víricos son entonces sintetizados, procesados y transportados al citoplasma, donde serán traducidos para producir las distintas proteínas del virus (Felber *et al.*, 2007). Así, las proteínas estructurales, y los productos génicos de *gag* y *pol*, se ensamblan dentro de nucleocápsidas inmaduras. Posteriormente, durante la gemación, estas poliproteínas virales son procesadas por la acción de la PR viral para dar lugar a la partícula infecciosa madura (revisado en Lever *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2007).

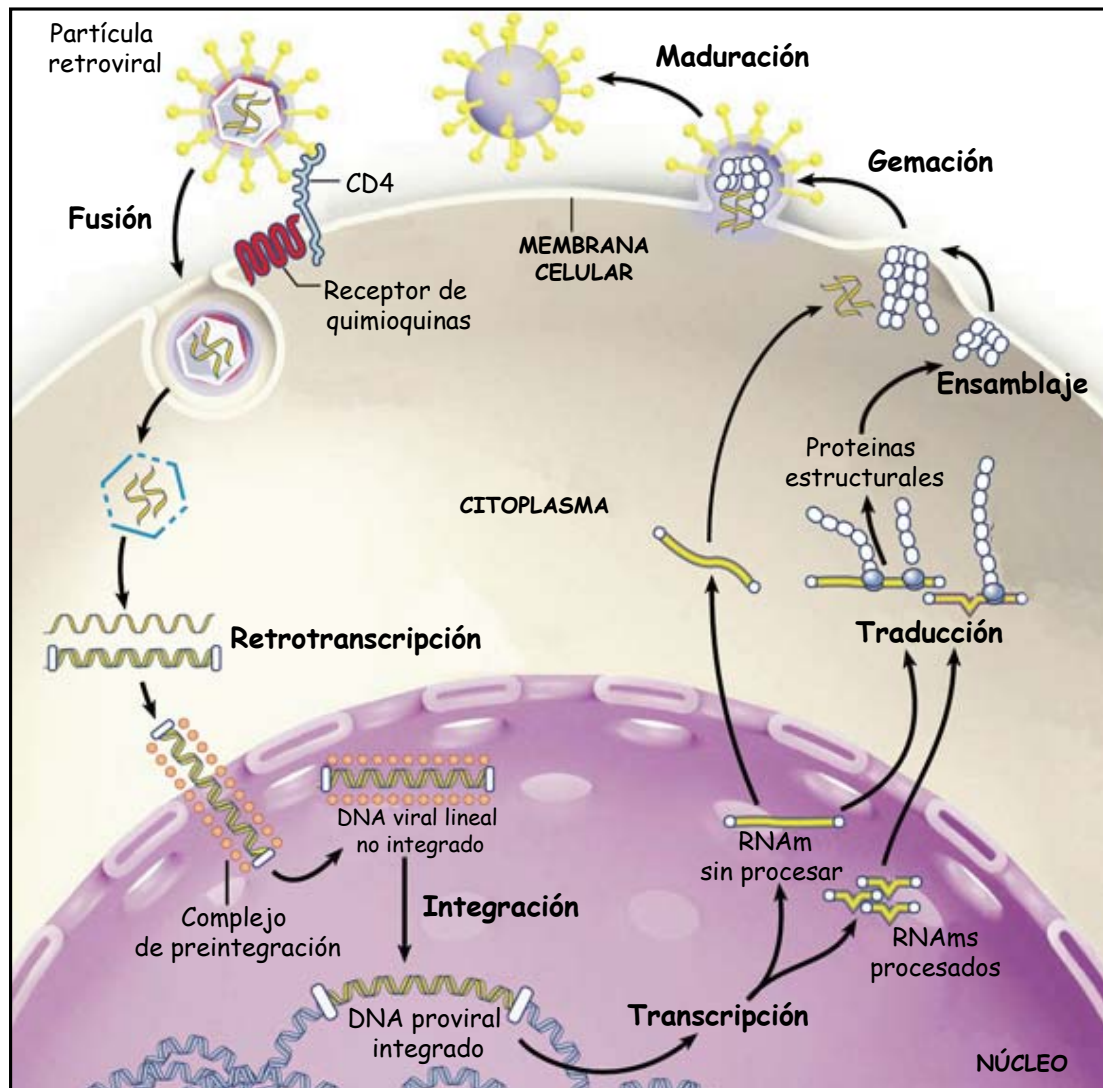


Figura 2. Resumen del ciclo de replicación del VIH, desde la adsorción y fusión con una célula hasta la producción y salida de nuevas partículas virales. (Figura adaptada de Furtado *et al.*, 1999).

1.2 La RT del VIH-1

1.2.1 Características y función

La RT es la enzima clave en el ciclo biológico de los retrovirus, ya que cataliza la síntesis del DNA de doble cadena a partir de RNA genómico monocatenario (revisado en: [Telesnitsky y Goff, 1997](#); [Basavapathruni y Anderson, 2007](#)). La RT es una enzima multifuncional que presenta actividades DNA polimerasa dependiente de RNA y de DNA y actividad endonucleasa [ribonucleasa H (RNasa H)], además de capacidad de cambio de molde y desplazamiento de cadena (revisado en [Götte *et al.*, 1999](#)).

La RT del VIH-1 está constituida por dos subunidades de 66 y 51 kDa, respectivamente ([Di Marzo Veronese *et al.*, 1986](#); [Lightfoot *et al.*, 1986](#)). Aunque no se conoce con exactitud cuáles son los intermediarios en el procesamiento de Gag-Pol que llevan a la formación del heterodímero funcional p66/p51, se sabe que in vitro, homodímeros p66/p66 pueden convertirse en heterodímeros p66/p51 por acción de la PR viral. Esta enzima realiza un corte endoproteolítico, entre los aminoácidos 440 y 441, en una de las dos cadenas que forman el homodímero.

Los dominios catalíticos funcionales necesarios para las actividades DNA polimerasa y RNasa H, se encuentran en la subunidad p66. El dominio DNA polimerasa se encuentra situado hacia el extremo N-terminal, y el dominio RNasa H abarca los últimos 120 aminoácidos del extremo C-terminal. La región denominada “connection” es la que se encarga de conectar ambos dominios catalíticos. Esta región es sensible a la acción de la PR ([Arts y Wainberg, 1996](#); [Hottiger y Hübscher, 1996](#)). La subunidad p51 no parece contribuir directamente a la actividad de la enzima. Sin embargo, se ha demostrado que p51 contribuye a la estabilidad del heterodímero, y al mantenimiento de la conformación correcta de p66 durante el inicio de la retrotranscripción ([Arts *et al.*, 1996](#); [Depollier *et al.*, 2005](#)). También parece estar implicada en el proceso de unión de la RT al molde-iniciador ([Harris *et al.*, 1998b](#)).

1.2.2 Motivos conservados en las DNA y RNA polimerasas

Las DNA y RNA polimerasas presentan cierta homología, ya que existen residuos comunes a todas ellas, a pesar de las diferencias en su secuencia (Delarue *et al.*, 1990). Todas las polimerasas presentan dos motivos, A y C, que se caracterizan por poseer cada uno un residuo de ácido aspártico muy conservado. En las polimerasas dependientes de DNA no se encuentran los motivos D y E, presentes en las polimerasas dependientes de RNA (Joyce y Steitz, 1995; Sousa, 1996; Willis *et al.*, 2002) (Figura 3). Además de los motivos A-E, existen otros dos motivos denominados 1-2 que se encuentran conservados en RTs de retrovirus, DNA polimerasas dependientes de RNA y en numerosos retroelementos (revisado en Menéndez-Arias, 2002b).

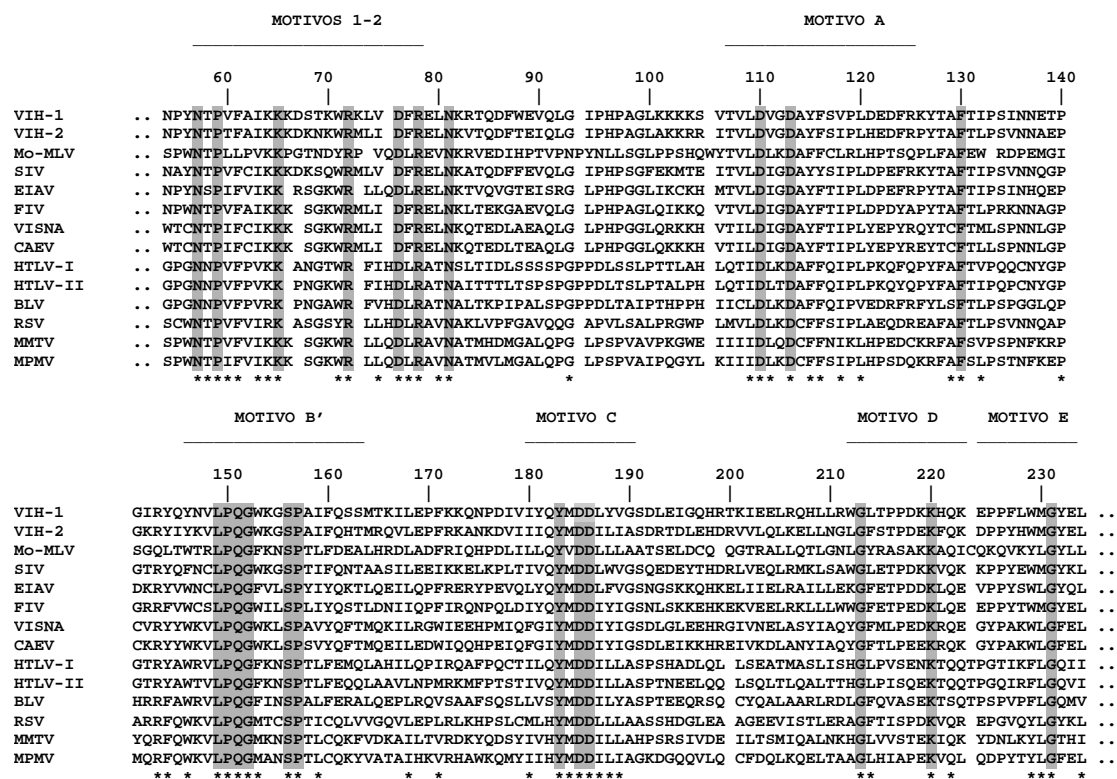


Figura 3. Alineamientos de secuencia de RTs de retrovirus. Se muestran los motivos conservados 1-2, A, B', C, D y E del dominio polimerasa. La numeración corresponde a la secuencia de la RT del VIH-1. Los residuos conservados se indican mediante un asterisco bajo el alineamiento. Los aminoácidos estrictamente conservados se encuentran sombreados. Las abreviaturas utilizadas son: VIH-1, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; VIH-2, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2; Mo-MLV, virus Moloney de la leucemia de ratón; SIV, virus de la inmunodeficiencia de simios; EIAV, virus de la anemia infecciosa equina; FIV, virus de la inmunodeficiencia felina; VISNA, virus Visna; CAEV, virus de la encefalitis artrítica de cabra; HTLV-I, virus de la leucemia de células T humana tipo I; HTLV-II, virus de la leucemia de células T humana tipo II; BLV, virus de la leucemia bovina; RSV, virus del sarcoma de Rous; MMTV, virus del tumor mamario de ratón; MPMV, virus Mason-Pfizer de monos.

1.2.3 Estructura de la RT

La estructura cristalográfica de la RT del VIH-1 ha sido determinada en ausencia de ligando (Esnouf *et al.*, 1995; Rodgers *et al.*, 1995; Hsiou *et al.*, 1996), asociada a complejos molde-iniciador formados por DNA heteropolimérico (Jacobo-Molina *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1997; Sarafianos *et al.*, 1999), asociada a complejos RNA/DNA portadores de varios residuos de purina (polipurina) (Sarafianos *et al.*, 2001), asociada a inhibidores no análogos a nucleósido (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Smerdon *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1995a,b; Ren *et al.*, 1995a,b; Das *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1996; Esnouf *et al.*, 1997; Hsiou *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1998a,b, 2000; Himmel *et al.*, 2005; revisado en Das *et al.*, 2005, 2007) o a análogos a nucleótido como el tenofovir (Tuske *et al.*, 2004). También se ha obtenido la estructura de la RT acomplejada con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y el dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998).



Figura 4. Estructura de la RT del VIH-1 formando un complejo con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y dTTP (PDB 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). En morado se representa la subunidad p66 de la RT. Se nombran los subdominios que forman el dominio con actividad polimerasa: "fingers", "palm", y "thumb", y el dominio con actividad RNaseH. En azul aparece representada la subunidad p51 de la RT. En el complejo molde-iniciador, la cadena que forma el molde se representa en verde y la que forma el iniciador en blanco. En naranja se muestra el nucleótido trifosfato entrante, dTTP. Esta figura se ha realizado con el programa "PyMOL Molecular Graphics System" (DeLano Scientific).

Los análisis estructurales han revelado que ambas subunidades de la RT (p66 y p51) contienen 4 subdominios comunes denominados “fingers”, “palm”, “thumb” y “connection”, y un dominio RNasa H que se encuentra únicamente en la subunidad p66 (Kohlstaedt *et al.*, 1992) (Figura 4). El empaquetamiento de los subdominios de la unidad p66 da lugar a una estructura que se asemeja a una mano derecha abierta, creando una hendidura donde interacciona el complejo molde-iniciador. Esta hendidura está formada por residuos altamente conservados de los subdominios “fingers” y “palm” junto con dos hélices α del subdominio “thumb”, que posicionan al complejo molde-iniciador en la orientación adecuada para la catálisis. En el centro activo se localizan tres residuos de ácido aspártico, Asp-110, Asp-185 y Asp-186, que forman la triada catalítica, imprescindible para que se lleve a cabo la reacción de polimerización (Larder *et al.*, 1987; Le Grice *et al.*, 1991; Lowe *et al.*, 1991; Boyer *et al.*, 1992b; Hostomsky *et al.*, 1992; Kaushik *et al.*, 1996). El plegamiento de los subdominios de la subunidad p51 ocurre de forma diferente al de la subunidad p66, a pesar de que sus secuencias de aminoácidos son idénticas hasta el residuo Phe-440. Así, en esta subunidad, los residuos catalíticos ocupan una posición interna en la molécula debido a que el subdominio “fingers” se cierra sobre el subdominio “palm” (revisado en: Hottiger y Hübscher, 1996; Menéndez-Arias, 2002b).

En la estructura cristalográfica de la RT acomplejada con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y el dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998), se observan diversos residuos en torno al centro activo que podrían tener un papel importante en la actividad polimerasa, a través de posibles interacciones con el complejo molde-iniciador, el dNTP entrante, y otros residuos de la RT. El grupo trifosfato del dNTP se encuentra coordinado por las cadenas laterales de los residuos Lys-65 y Arg-72, las cadenas principales de los residuos Asp-113 y Ala-114, y un átomo de magnesio (Figura 5). Las cadenas laterales de la Arg-72 y la Gln-151 se sitúan en la cara externa de la base nitrogenada del dNTP entrante, mientras su anillo de ribosa se sitúa en una hendidura definida por las cadenas laterales de los residuos Asp-113, Tyr-115, Phe-116 y Gln-151. Otros residuos como Leu-74, Pro-157, Phe-160, Tyr-183 y Met-184 podrían afectar también a la unión del dNTP, aunque de manera indirecta (Huang *et al.*, 1998).

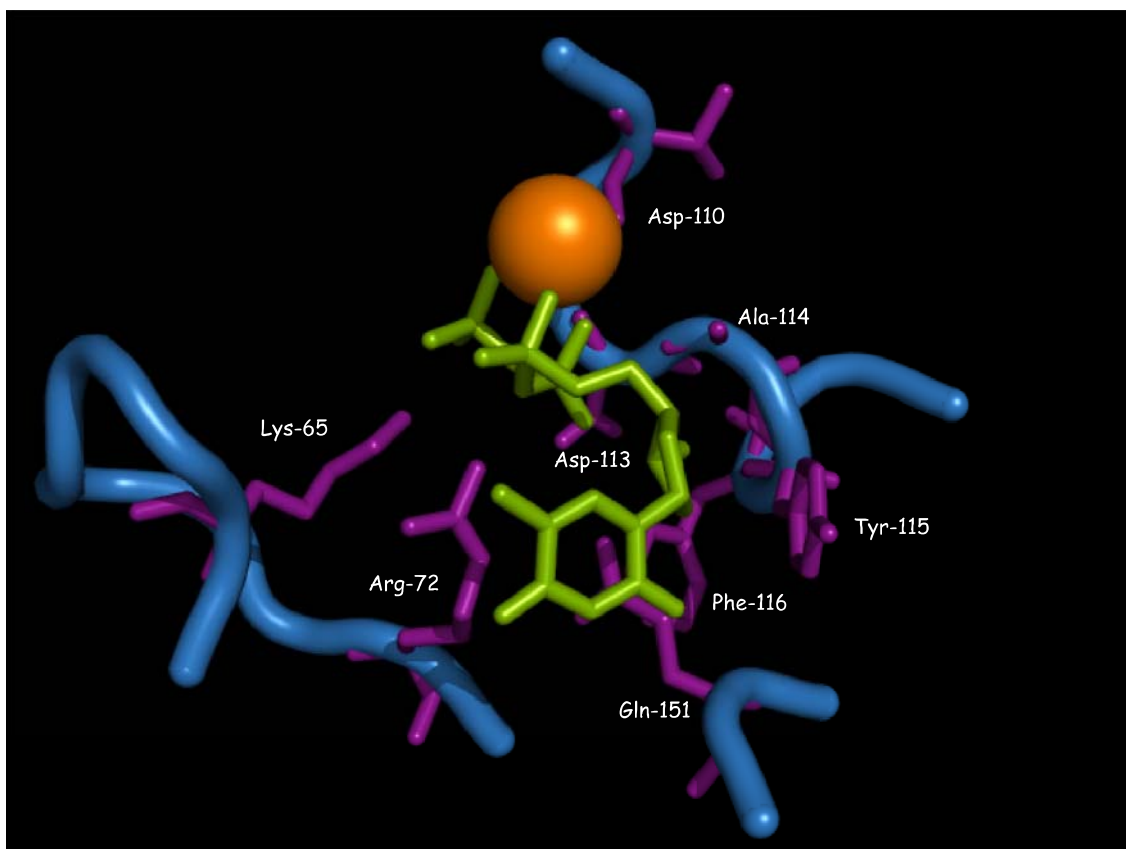


Figura 5. Localización del sitio de unión del dNTP en la estructura de la RT del VIH-1. Se muestran en morado, los residuos más relevantes para la unión del dNTP (en verde). El átomo de Mg^{2+} que se coordina con el dNTP se representa en naranja. Las coordenadas han sido obtenidas del Protein Data Bank (código 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). Esta figura se ha realizado con el programa "PyMOL Molecular Graphics System" (DeLano Scientific).

1.2.4 Residuos importantes para la actividad DNA polimerasa de la RT

El papel que juegan los distintos aminoácidos en la actividad DNA polimerasa de la RT ha sido extensamente estudiado, generándose numerosos cambios de aminoácidos entre las posiciones 65 y 205. Los primeros estudios, que se realizaron con extractos celulares o enzimas parcialmente purificadas, proporcionaron estimaciones algo imprecisas. No obstante, se observó que los residuos Asp-110, Asp-185 y Asp-186, eran críticos para mantener la actividad DNA polimerasa de la RT (Kaushik *et al.*, 1996), y que sustituciones de los residuos situados en el entorno del sitio de unión del dNTP, como Arg-72, Asp-113, Ala-114, Tyr-115, Gln-151, Met-184 o Tyr-183, producían una disminución importante de la actividad catalítica (Larder *et al.*, 1989b; Wakefield *et al.*, 1992; Boyer *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1996; Wrobel *et al.*, 1998). Posteriormente, los efectos de los distintos cambios de aminoácido sobre la actividad DNA polimerasa de la RT se han analizado con mayor detalle, utilizando para ello enzimas purificadas. En la [Tabla 1](#) se muestra un resumen de los mutantes estudiados

y las conclusiones más relevantes de estos trabajos de cara a las relaciones estructura-función de la RT del VIH-1.

Tabla 1. Efecto de cambios de aminoácido sobre la actividad DNA polimerasa de la RT del VIH-1

RESIDUO	COMENTARIOS	REF.
Trp-24	Su sustitución por Gly, únicamente en la subunidad p66, da lugar a un aumento del 20% en la actividad polimerasa. Sin embargo, cuando se combina con el cambio F61G se produce una disminución drástica de la actividad polimerasa.	(1)
Phe-61	Las sustituciones F61L, F61W y F61Y parecen incrementar ligeramente la actividad polimerasa de la enzima. La actividad de F61A es similar a la de la RT "wild-type" (WT), excepto al utilizar un molde RNA heteropolimérico, con el que disminuye en un 50%. La sustitución de Phe por Gly, únicamente en la subunidad p66, provoca una disminución de la actividad polimerasa del 40%.	(1-3)
Lys-65	El cambio K65R disminuye drásticamente la actividad polimerasa de la RT. Sin embargo, los cambios K65R, K65A y K65Q la disminuyen moderadamente tanto sobre moldes DNA como RNA. Cualquier cambio de aminoácido, excepto K65R, incrementa el valor de K_m para el dNTP y disminuye la eficacia catalítica de la enzima. La delección de 5 aminoácidos entre las posiciones 65 y 69 (horquilla $\beta 3\text{-}\beta 4$) produce una reducción de 15 veces en la eficacia catalítica de la enzima.	(4-7)
Thr-69	El cambio T69N no afecta de manera importante a la actividad polimerasa de la enzima. La sustitución T69S acompañada de una inserción Ser-Ser entre los codones 69 y 70, produce un aumento de la eficacia catalítica, debido a un incremento en la V_{max} . Sin embargo, se observa una disminución de la eficacia catalítica cuando T69S aparece acompañada de una inserción (Ser-Ser, Ser-Gly, Ser-Ala) en un contexto de secuencia con varias mutaciones de resistencia a análogos de timidina.	(8, 9)
Asp-67, Trp-71, Phe-77	Las sustituciones D67G, D67N, F77Y y F77V, no afectan de manera importante a la actividad polimerasa de la enzima, siendo ésta superior al 85%. En general, los cambios que afectan al Trp-71 conducen a la pérdida total o casi total de la actividad polimerasa.	(8)
Arg-72	Los cambios R72A y R72K producen una disminución de la k_{cat} que varía dependiendo del tipo de molde. La enzima portadora del cambio R72A carece de actividad pirofosforolítica.	(10, 11)
Leu-74	Las RTs portadoras de los cambios L74I y L74V presentan una actividad polimerasa superior al 75%.	(8, 12)
Asp-76, Arg-78	Los mutantes R78A, R78S, R78L, R78I, R78T, R78V, R78C y R78G, presentaron una actividad polimerasa entre 25 y 35% relativa a la de la RT WT, mientras que los mutantes R78Y, R78E y R78P exhibieron una actividad bastante más reducida, entre el 5 y 10%. D76V mantiene el 80% de la actividad polimerasa.	(13, 14)
Glu-89	El cambio E89G provoca una disminución moderada de la afinidad de la enzima por los dNTPs.	(15)
Asp-110	Los mutantes D110A y D110S muestran una menor eficacia catalítica respecto a la RT WT, manifestándose las diferencias a nivel de la k_{cat} .	(16)
Asp-113	Las sustituciones D113A y D113E producen una pérdida importante de actividad polimerasa, proporcionando una actividad catalítica menor del 20% con respecto a la de la RT WT.	(4)
Ala-114	Los mutantes A114S y A114G presentan una actividad polimerasa similar a la de la enzima WT. Las enzimas A114T y A114V mostraron una baja eficacia catalítica debido a sus valores elevados de K_m . El cambio A114G incrementó en 5-6 veces la capacidad de la RT para discriminar entre dNTPs y ddNTPs.	(17)
Tyr-115	Un análisis sistemático del efecto de sustituciones en esta posición muestra que sólo la enzima con el cambio Y115F mantiene una eficacia catalítica similar a la de la RT WT, mientras que cambios no conservativos en este residuo dan lugar a enzimas con menor afinidad por los dNTPs.	(4, 12, 18-21)
Phe-116	La actividad polimerasa de los mutantes F116V y F116W sobre un complejo DNA/DNA es algo mayor que la obtenida para la RT WT. La actividad DNA polimerasa dependiente de RNA del mutante F116V fue muy similar a la de la RT WT.	(21, 22)

(continuación Tabla 1)

Phe-130	La introducción del cambio F130W únicamente en la subunidad p66 mantiene una eficacia catalítica similar a la RT WT, aunque cuando este cambio aparece en p51 no se obtiene una RT activa.	(22)
Gln-151	Las sustituciones Q151A y Q151K provocan una disminución de la actividad polimerasa, debido a que sus valores de k_{cat} disminuyen con respecto a los de la RT WT. En cambio, las sustituciones Q151N y Q151M dan lugar a unas RTs con eficacia catalítica similar a la de la RT WT.	(4, 23-26)
Gly-152, Trp-153	Todas las sustituciones realizadas en la posición 152, G152A, G152S, G152T y G152I, dieron lugar a enzimas prácticamente inactivas, en ensayos realizados con diversos moldes RNA y DNA. Los cambios W153A y W153Y produjeron un descenso en la actividad catalítica de la RT de aproximadamente el 50%. El cambio W153F dio lugar a un mutante con una actividad catalítica similar a la de la RT WT.	(25, 27)
Phe-160	Es necesario un aminoácido aromático en esta posición para mantener la actividad polimerasa de la RT. La baja eficacia catalítica de mutantes como F160I, F160A y F160Q es debida a su menor afinidad por los dNTPs.	(28)
Ile-167	Todas las sustituciones en la posición 167, con la excepción de I167T, dieron lugar a pérdidas significativas de la actividad DNA polimerasa.	(27)
Val-179	La enzima con el cambio V179D mantiene una eficacia catalítica similar a la de la RT WT.	(29)
Tyr-181	Los cambios Y181C, Y181W, Y181I y Y181V no alteran la actividad polimerasa de estas enzimas de manera significativa.	(21, 30, 31)
Tyr-183	Su sustitución por Ala, Phe o Ser provoca una disminución de la actividad polimerasa de la RT como consecuencia de una disminución moderada de su afinidad por los dNTPs.	(4, 32, 33)
Met-184	La sustitución M184A provoca un aumento de la K_m de 6 veces en ensayos en los que se usó un complejo poli(rA)•oligo(dT) como sustrato. El cambio M184L da lugar a una disminución en la eficacia catalítica de la RT.	(34-36)
Asp-185, Asp-186	Las RTs con sustituciones en los residuos de ácido aspártico 185 y 186, como D185A, D185E, D185N, D186A, D186E o D186N, muestran una menor eficacia catalítica respecto a la RT WT, causada por descensos significativos de sus valores de k_{cat} .	(15)
Leu-187, Val-189	La sustitución de Leu-187 por otros aminoácidos como Ala o Asp afectó de manera importante a la actividad polimerasa, mientras que las sustituciones V189A, V189I y V189M incrementaron la actividad de la enzima.	(27)
Gly-190	El cambio G190E produce una reducción de la actividad polimerasa del 40%, dando lugar a una RT muy poco procesiva, lo que afecta a la síntesis de DNA y a la degradación del RNA molde.	(37)
Lys-220	La sustitución K220Q produce una disminución de 8 veces de la eficacia catalítica de la enzima respecto a la de la RT WT.	(38)
Trp-229, Met-230, Gly-231, Trp-232	La sustitución de cada uno de estos residuos por Ala da lugar a RTs mutantes que presentan una actividad polimerasa sensiblemente menor a la de la RT WT. El efecto más drástico lo produce el cambio W229A seguido del cambio M230A. La mutación M230I genera una enzima con una actividad polimerasa similar a la de la RT WT.	(39-41)
Gly-262, Trp-266	Su sustitución por Ala da lugar a RTs con una disminución en la actividad polimerasa no superior al 10% respecto a la de la RT WT, pero con un aumento considerable de la constante de disociación del complejo molde-iniciador.	(42)
Tyr-318	Las enzimas Y318F e Y318W retienen una actividad polimerasa similar a la de la RT WT, mientras que los cambios Y318K, Y318C, Y318H e Y318L dan lugar a RTs cuya actividad polimerasa es menor al 5% de la presentada por la RT WT.	(43)

Las referencias (Ref.) corresponden a los siguientes artículos: (1) Agopian *et al.*, 2007; (2) Fisher y Prasad, 2002; (3) Fisher *et al.*, 2003; (4) Harris *et al.*, 1998a; (5) Gu *et al.*, 1994; (6) Sluis-Cremer *et al.*, 2000; (7) Garforth *et al.*, 2007; (8) Kim *et al.*, 1996; (9) Curr *et al.*, 2006; (10) Sarafianos *et al.*, 1995a; (11) Lewis *et al.*, 1999; (12) Jonckheere *et al.*, 2000; (13) Kim *et al.*, 1998; (14) Kim *et al.*, 1999; (15) Kew *et al.*, 1994; (16) Kaushik *et al.*, 1996; (17) Cases-González y Menéndez-Arias, 2005; (18) Martín-Hernández *et al.*, 1996 (19) Martín-Hernández *et al.*, 1997; (20) Boyer y Hughes, 2000; (21) Boyer *et al.*, 2000; (22) Olivares *et al.*, 2004; (23) Sarafianos *et al.*, 1995b; (24) Kaushik *et al.*, 1997; (25) Weiss *et al.*, 2000; (26) Weiss *et al.*, 2002; (27) Sharma *et al.*, 2002; (28) Gutiérrez-Rivas *et al.*, 1999; (29) Kleim *et al.*, 1996; (30) Sardana *et al.*, 1992; (31) Shih *et al.*, 1991; (32) Larder *et al.*, 1987; (33) Lowe *et al.*, 1991; (34) Pandey *et al.*, 1996; (35) Bakhanashvili *et al.*, 1996; (36) Julias *et al.*, 2004; (37) Fan *et al.*, 1996; (38) Canard *et al.*, 1999; (39) Wöhrle *et al.*, 1997; (40) Jacques *et al.*, 1994; (41) Gutiérrez-Rivas y Menéndez-Arias, 2001; (42) Beard *et al.*, 1994; (43) Pelemans *et al.*, 1998.

Existen numerosos estudios en los que se han llevado a cabo mutaciones de los residuos que participan directa o indirectamente en la unión del dNTP. Cabe destacar los que interaccionan directamente en esta unión como por ejemplo los referidos a Ala-113, Ala-114, Tyr-115, Phe-116 y Gln-151. Sustituciones conservativas y no conservativas de la posición 113 ocasionaron una disminución de más del 90% de la actividad polimerasa (Harris *et al.*, 1998a). Los cambios en la posición 114 dieron lugar a enzimas con igual (A114S y A114G) o menor (A114T y A114V) eficacia catalítica que la enzima WT (Cases-González y Menéndez-Arias, 2005). La sustitución de la Tyr-115 por aminoácidos no aromáticos dio lugar a enzimas con mucha menor eficacia catalítica (Martín-Hernández *et al.*, 1996, 1997). Por el contrario, las mutaciones Y115F y F116Y no produjeron un efecto significativo sobre la actividad polimerasa de la RT (Martín-Hernández *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 2000). Las mutaciones Q151M y Q151N apenas afectaron a la actividad polimerasa de la RT (Weiss *et al.*, 2000, 2002, 2004).

Estudios de residuos más alejados del centro activo, como los situados en la región denominada “primer grip” (Met-230) o en la región que interacciona con el extremo 5’ desapareado del molde (Arg-78) dieron lugar a RTs con igual (M230I) (Gutiérrez-Rivas y Menéndez-Arias, 2001) o menor (M230A, R78A) (Wöhrl *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999) actividad polimerasa.

1.2 Tratamiento antirretroviral

Debido al importante papel que juega la RT en el ciclo de replicación viral del VIH, esta enzima ha sido una diana crucial en el estudio de fármacos antirretrovirales. Basándose en la estructura y en el mecanismo de acción, los inhibidores de la RT pueden clasificarse en dos grandes grupos: análogos a nucleósido/nucleótido (NRTIs) y no análogos a nucleósido (NNRTIs) (Figura 6).

En la actualidad las terapias más comunes son las terapias HAART, del inglés, “highly active antiretroviral therapy” que consisten en una combinación de inhibidores. Las terapias HAART más frecuentes incluyen uno o dos NRTIs, un NNRTI y/o un inhibidor de la proteasa y en ocasiones, un inhibidor de la fusión. Un ejemplo de terapia HAART muy utilizada es la basada en tenofovir, emtricitabina y efavirenz, y comercializada como Atripla.

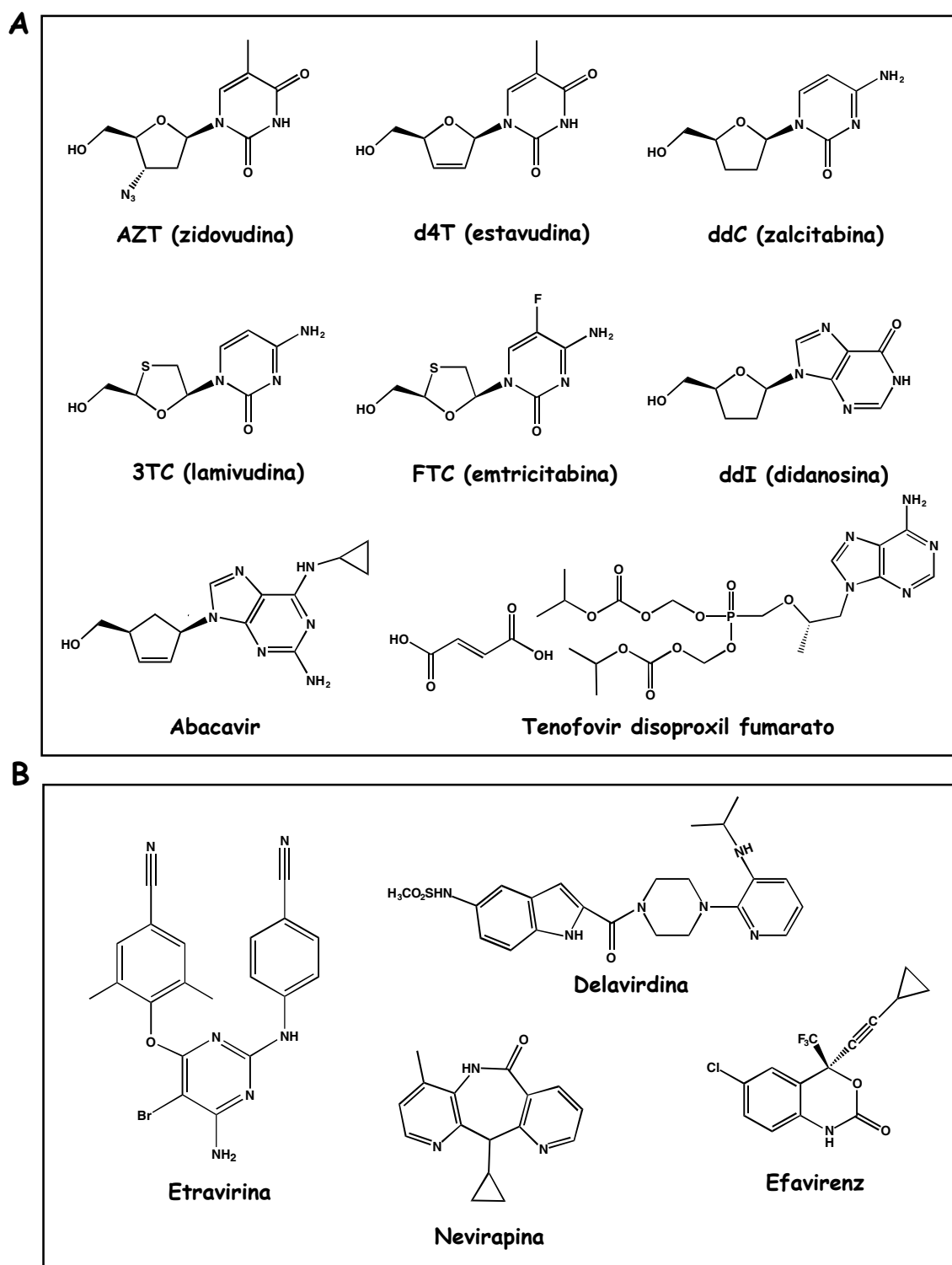


Figura 6. Estructuras químicas de NRTIs (A) y NNRTIs (B) aprobadas para su uso clínico.

Las terapias combinadas han mejorado notablemente la duración y la calidad de vida de los pacientes infectados por el VIH (*Palella et al., 1998; Carpenter et al., 2000*). Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos se ve limitada por factores como la tolerabilidad, la adherencia a los fármacos y la toxicidad a largo plazo. Además, la

alta tasa de mutación del VIH y su elevada frecuencia de recombinación (Menéndez-Arias, 2002b) ha llevado a la emergencia de variantes virales resistentes a fármacos que implican un fracaso en el tratamiento antirretroviral (Menéndez-Arias, 2002a; Johnson *et al.*, 2007).

1.2.1 Inhibidores análogos a nucleósido

Existen siete inhibidores análogos a nucleósido aprobados para el tratamiento de pacientes infectados con el VIH: β -D-(+)-3'-azido-3'-desoxitimidina (zidovudina, **AZT**), β -D-(+)-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxitimidina (estavudina, **d4T**), β -D-(+)-2',3'-didesoxiinosina (didanosina, **ddl**), β -D-(+)-2',3'-didesoxicitidina (zalcitabina, **ddC**), β -L-(-)-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina, (lamivudina, **3TC**), (-)-(1S,4R)-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-yl]-2-ciclopenten-1-metanol (**abacavir**) y β -L-(-)-2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina (emtricitabina, **FTC**), así como un inhibidor análogo a nucleótido derivado de fosfonato acíclico: R-9-(2-fosfonometoxipropil)adenina (**tenofovir**), comercializado como tenofovir disoproxil fumarato (Figura 6A). Además existen otros NRTIs en distintas fases de desarrollo preclínico (Kim *et al.*, 2001; Dutschman *et al.*, 2004; Bethell *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2006; Wainberg *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Estos inhibidores de la RT deben ser fosforilados por las quinasas celulares a sus derivados 5'-trifosfato, para actuar como inhibidores competitivos del sustrato natural de la RT y ser incorporados en el DNA. Los NRTIs actúan como terminadores de cadena ya que carecen del grupo 3'-OH en su anillo de ribosa. Así, su incorporación bloquea la elongación de la cadena de DNA naciente.

La eficacia terapéutica de los NRTIs está condicionada, en parte, por la eficiencia del proceso de activación de los fármacos por parte de las quinasas celulares (revisado en Merta *et al.*, 1992; Kakuda *et al.*, 2000; De Clercq y Holý, 2005; Schinazi *et al.*, 2006). Otros factores que pueden limitar el buen funcionamiento de los NRTIs son la absorción, transporte, metabolismo e incorporación de éstos. Así, tratamientos continuados con NRTIs se han asociado con cuadros clínicos de hiperlactemia y acidosis láctica, neuropatías, pancreatitis y más recientemente, lipoatrofia (Nolan y Mallal, 2004). Algunos de estos efectos secundarios parecen estar relacionados con la inhibición de la DNA polimerasa mitocondrial γ (Lewis *et al.*, 2003; Kohler y Lewis, 2007).

A		M E	D K		V		L T K
	Zidovudina (AZT)	41 44	67 70		118		210 215 219
		L D	N R		I		W Y/F Q/E
		M E	D K V		V		L T K
	Estavudina (3TC)	41 44	67 70 75		118		210 215 219
		L D	N R I		I		W Y/F Q/E
			K L				
	Didanosina (ddI)		65 74				
			R V				
			K T L				
	Zalcitabina (ddC)		65 69 74				
			R D V				
			K L	Y		M	
	Abacavir		65 74	115		184	
			R V	F		I	
		E K		V		M	
	Lamivudina (d4T)	44 65		118		184	
		D R		I		V/I	
			K K				
	Tenofovir		65 70				
			R E				
			K			M	
	Emtricitabina (FTC)		65			184	
			R			I	
		M E	D K		V		L T K
	Multirresistencia asociada a NRTIs	41 44	67 70		118		210 215 219
		L D	N R		I		W Y/F Q/E
		M A	▼ K				L T K
	Multirresistencia: Complejo 69SS	41 62	69 70				210 215 219
		L V	R				W Y/F Q/E
		A	V F	F	Q		
	Multirresistencia: Complejo 151	62	75 77	116	151		
		V	I L	Y	M		
B			L K V V		Y Y G		
	Nevirapina		100 103 106 108		181 188 190		
			I N A/M I		C/I C/L/H A		
			K V		Y Y		P
	Delavirdina		103 106		181 188		236
			N M		C/I L		L
			L K V V		Y Y G		P
	Efavirenz		100 103 106 108		181 188 190		225
			I N M I		C/I L S		H
		V A L K V		Y	G		
	¹ Etravirina	90 98 100 101 106		181	190		
		I G I E/P M		C/I/V	S/A		
			K V		Y		
	² Resistencia a múltiples NNRTIs		103 106		188		
			N M		L		
			L V	Y	G		M
	² Resistencia a múltiples NNRTIs		100 106	181	190		230
			I A	C/I	S/A		I

Figura 7. Mutaciones en la RT asociadas a resistencia a NRTIs (A) y a NNRTIs (B). No se conoce el significado de las mutaciones E44D o V118I cuando aparecen aisladas y por esta razón no se representan en negrita. ▼ indica una inserción de dos aminoácidos (Ser-Ser, Ser-Ala o Ser-Gly) entre los codones 69 y 70.

¹ El impacto de la mayoría de las mutaciones depende de su presencia simultánea con Y181C. Y181C sólo tiene impacto cuando están presentes una o más de estas mutaciones.

² La repuesta virológica a largo plazo cuando dos o más de estas mutaciones están presentes es muy pequeña. (Figura adaptada de Johnson *et al.*, 2007).

El primer compuesto utilizado en terapia contra la infección por el VIH-1, fue el AZT. Pasado cierto tiempo se observó que la sensibilidad a esta droga disminuía en pacientes sometidos a terapia con dicho fármaco (Larder *et al.*, 1989a,c). Las primeras mutaciones de resistencia a AZT descritas fueron D67N, K70R, T215F/Y y K219Q (Larder y Kemp, 1989). Tras la incorporación a las terapias de nuevos fármacos de este grupo, como ddC, ddI o d4T, se identificaron muchas otras mutaciones de resistencia. Estas mutaciones normalmente afectan a residuos próximos al sitio de unión del nucleótido, que están interaccionando con el dNTP entrante (p.ej.: Q151M, M184V, Y115F, etc) o con la hebra del molde cercana al sitio de incorporación (p.ej.: L74V, V75I, V75T, etc.). También existen otras posiciones implicadas en resistencia que se encuentran relativamente lejos del sitio de unión del dNTP, como por ejemplo las mutaciones en las posiciones 67 y 70 que están aproximadamente a 10 Å de los residuos conservados de ácido aspártico que forman parte del centro activo, o los residuos 41, 215 y 219 que se encuentran a más de 20 Å de distancia (Huang *et al.*, 1998). En la Figura 7A se muestra un resumen con las mutaciones de resistencia en la RT del VIH-1 asociadas al uso de los NRTIs.

La resistencia a NRTIs puede darse a través de dos mecanismos moleculares diferentes, bien por discriminación en la incorporación entre los dNTPs naturales y los NRTIs fosforilados, o bien por la escisión de los inhibidores una vez incorporados en la cadena creciente de DNA.

A) Discriminación en la incorporación del NRTI

Mediante este mecanismo se reduce la capacidad de la RT para incorporar al DNA la forma trifosfato del inhibidor. En general, la adquisición de la resistencia viene dada por la emergencia de una o más mutaciones que confieren a la RT la habilidad de discriminar entre el sustrato natural (dNTP) y la forma trifosfato del NRTI. De esta forma, la resistencia está normalmente asociada con un descenso de la eficiencia catalítica para la incorporación del análogo a nucleósido trifosforilado. Esto puede ocurrir por una pérdida de afinidad por el inhibidor y/o por una reducción en su velocidad de incorporación.

En la Tabla 2 se muestran las mutaciones individuales que producen resistencia alterando su capacidad de discriminación entre nucleótidos, cuando están en un contexto de secuencia WT. Estas mutaciones se encuentran normalmente en el

sitio de unión del dNTP, cerca del centro activo de la enzima. Para incrementar los niveles de resistencia se suelen combinar o asociar con mutaciones secundarias que no confieren a la enzima ninguna ventaja por sí solas, pero que aumentan el efecto de las mutaciones principales.

Un ejemplo característico de este grupo son las mutaciones que afectan a la Met-184 y que confieren resistencia a 3TC. La resolución de estructuras cristalográficas de la RT portadora del cambio M184I en presencia y ausencia de un complejo molde-iniciador DNA/DNA, ha sugerido que la presencia de Ile (o eventualmente Val) en esta posición impide la unión del anillo oxatolano del 3TC, debido al mayor grosor de la cadena lateral del aminoácido que ocupa la posición 184 (Sarafianos *et al.*, 1999).

Tabla 2. Mutaciones en la RT que aumentan la capacidad de discriminación entre NRTIs fosforilados y dNTPs

MUTACIÓN	SUBDOMINIO	RESISTENCIA	MECANISMO DEPENDIENTE DE	COMENTARIOS	REF.
K65R	"fingers"	ddA, 3TC, tenofovir	k_{pol}	Suprime la resistencia a AZT	(1-6)
		ddC	$k_{pol}-K_d$		
K70E	"fingers"	Tenofovir, d4T, 3TC	k_{pol}	Su aparición precede a K65R y se excluyen mutuamente. Mecanismo mixto: discriminación-escisión	(6-8)
L74V	"fingers"	ddNs	$k_{pol}-K_d$	Suprime la resistencia a AZT	(2, 8, 10)
V75T	"fingers"	d4T	K_d	Mecanismo mixto: discriminación-escisión	(1, 11-13)
Q151M	"palm"	Multirresistencia	k_{pol}	Aparece asociada con 4 mutaciones: (A62V/V75I/F77L/F116Y)	(3, 13-17)
M184V	"palm"	3TC	K_d	Antagonista de K65R (suprime resistencia a tenofovir)	(2, 3, 17-21)
		Abacavir	$k_{pol}-K_d$		

Las referencias (ref.) corresponden a los siguientes artículos: (1) Selmi *et al.*, 2001b; (2) Deval *et al.*, 2004a, b; (3) Deval *et al.*, 2005; (4) Feng *et al.*, 2006; (5) White *et al.*, 2006 (6) Sluis-Cremer *et al.*, 2007; (7) Kagan *et al.*, 2007; (8) Van Houte *et al.*, 2006; (9) Ueno *et al.*, 1997; (10) Martin *et al.*, 1993; (11) Lacey y Larder, 1994; (12) Petropoulos *et al.*, 2000; (13) Lennerstrand *et al.*, 2001; (14) Ueno *et al.*, 1999; (15) Kaushik *et al.*, 2000; (16) Deval *et al.*, 2002; (17) Ray *et al.*, 2002a; (18) Feng y Anderson, 1999; (19) Sarafianos *et al.*, 1999; (20) Wilson *et al.*, 1996; (21) Ray *et al.*, 2002b.

B) Escisión de NRTIs

En el VIH-1, los elevados valores de resistencia a AZT se adquieren a través de la selección de mutaciones específicas en la RT, que incluyen M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y o T215F y K219Q o K219E (revisado en [Larder et al., 1994](#)). Generalmente dos o más de estas mutaciones incluyendo T215Y/F son necesarias para adquirir altos niveles de resistencia ([Lacey et al., 1992](#)). Estos cambios de aminoácido también aparecen en pacientes tratados con d4T ([Lin et al., 1994](#); [Pellegrin et al., 1999](#); [Izopet et al., 1999](#); [Coakley et al., 2000](#)) y confieren resistencia a este inhibidor aunque en menor medida que al AZT. De acuerdo con esto, a estas mutaciones se les ha denominado mutaciones de resistencia a análogos de timidina o TAMs (del inglés “thymidine analogue resistance mutations”).

El mecanismo de resistencia a AZT no está basado en la discriminación entre sustrato natural e inhibidor sino que se debe a la adquisición por parte de la enzima resistente de capacidad para desbloquear el extremo 3' del iniciador por un mecanismo de fosforolisis dependiente de ATP o pirofostato ([Arion et al., 1998](#); [Meyer et al., 1999](#); revisado en [Menéndez-Arias, 2002a](#); [Selmi et al., 2003](#); [Deval et al., 2004a](#); [Goldschmidt et al., 2004](#); [Sarafianos et al., 2004](#) y [Menéndez-Arias et al., 2006](#)). Esta reacción de escisión ocurre mediante un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo, bien del fosfato β o del fosfato γ del nucleótido que actúa como donador de PPi, o bien del propio PPi, al enlace fosfodiéster terminal del iniciador bloqueado con AZT-monofosfato (AZTMP) ([Figura 8](#)).

La actividad de la reacción de escisión ha sido bien caracterizada *in vitro*. Estos estudios han mostrado que la eficiencia de la escisión depende de varios factores como la naturaleza de la hebra molde (RNA o DNA) ([Rigourd et al., 2002](#); [Ray et al., 2003](#); [Nikolenko et al., 2005](#)), el contexto de secuencia del molde de DNA ([Meyer et al., 2004, 2007](#)) o el análogo de nucleósido que bloquea el iniciador. Así, los análogos de timidina (AZT, d4T y ddT) son los mejores sustratos, mientras que en general, los análogos de citidina (ddC y 3TC) y el carbovir monofosfato (producto del metabolismo de abacavir) se escinden de forma poco eficiente ([Meyer et al., 1999, 2000](#); [Boyer et al., 2001](#); [Mas et al., 2002](#); [Naeger et al., 2002](#); [Ray et al., 2003](#)).

La eficiencia de esta reacción también depende de la presencia del siguiente dNTP complementario al molde, ya que su unión conduce a la formación de un “dead end complex” que bloquea la reacción de escisión ([Figura 8](#)). El rescate de AZTMP no

se inhibe a concentraciones fisiológicas de dNTP ($CI_{50} > 0,25$ mM). Sin embargo, la escisión de d4TMP, ddTMP y ddAMP podría inhibirse a concentraciones celulares del siguiente nucleótido complementario ($CI_{50} = 0,5 - 25$ μ M) (Meyer *et al.*, 2000; Boyer *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002). Estos datos explicarían por qué las mutaciones de resistencia a TAMs confieren mayores niveles de resistencia a AZT que a d4T y ddl (cuyo metabolito activo es ddATP).

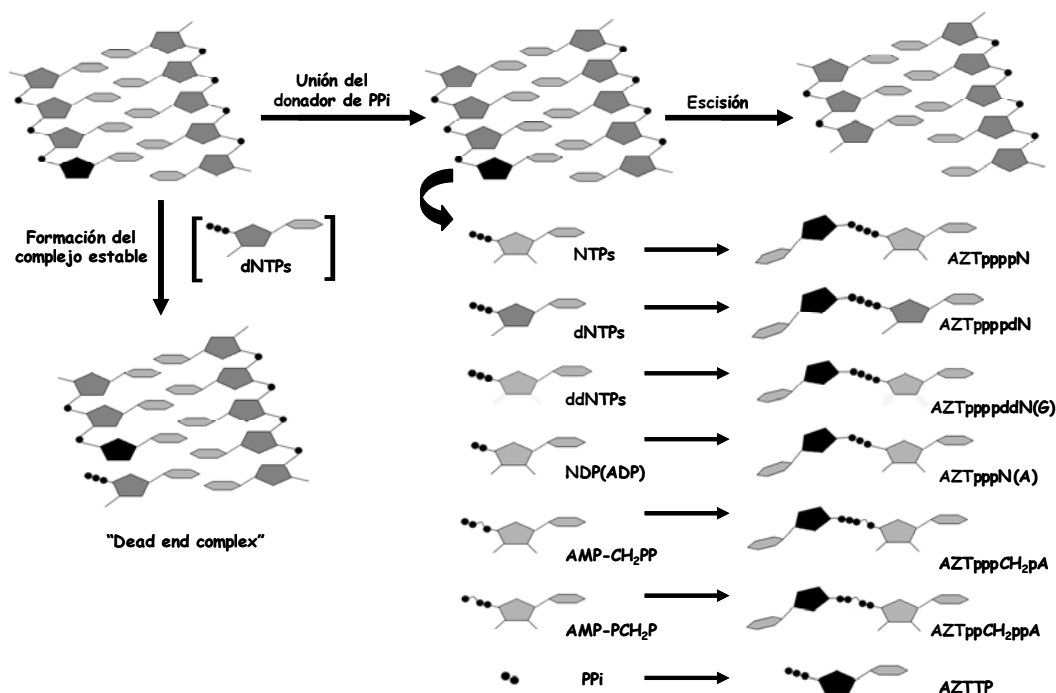


Figura 8. Representación esquemática de la reacción de escisión. En presencia de un donador de PPI se puede dar la reacción inversa a la polimerización (pifosforólisis). El fosfato γ del ATP es capaz de rescatar el inhibidor monofosfato (representado en negro) de la cadena creciente de DNA, formando un dinucleótido tetrafosfato. Las mayores eficiencias catalíticas para esta reacción se han obtenido con el PPI, aunque no existen grandes diferencias entre la RT WT y RTs resistentes (Arion *et al.*, 1998). También se muestran otros donadores de PPI que son capaces de escindir AZT monofosfato de iniciadores bloqueados como: nucleósidos difosfato y trifosfato o bien los compuestos AMPCH₂PP y AMPPPCH₂P que son análogos de ATP con grupos metileno en vez de fosfodiéster en las uniones α - β y β - γ respectivamente (Meyer *et al.*, 1998). Cuando existen niveles elevados de dNTPs se forma un complejo estable ("dead end complex") que impide que se dé la reacción de escisión (Tong *et al.*, 1997).

Otro parámetro importante para la reacción de escisión es el posicionamiento correcto del iniciador bloqueado con el inhibidor en su extremo 3'. Para que la reacción de escisión ocurra, el extremo 3' del iniciador bloqueado debería estar en el sitio N ("nucleotide binding site"), formando parte de un complejo pre-translocacional (complejo N) (Boyer *et al.*, 2001; Sarafianos *et al.*, 2002; Marchand y Gotte, 2003; revisado en Goldschmidt *et al.*, 2004; Sarafianos *et al.* 2004 y Menéndez-Arias *et al.*, 2006). Sin embargo, después de la unión del dNTP y la liberación del PPi, el extremo 3' del iniciador se transloca al sitio P ("primer site"), formando un complejo post-

translocacional (complejo P). Se ha demostrado por ensayos de “footprinting”, que antes de la unión del dNTP y después de la liberación del PPi, existe un equilibrio dinámico en el posicionamiento del extremo 3' del iniciador entre los sitios N y P (Marchand y Gotte, 2003). Según este modelo, el siguiente dNTP complementario bloquea la reacción de escisión porque fuerza el equilibrio hacia el estado post-translocacional (complejo P) (Marchand y Gotte, 2003). Las mutaciones de resistencia (TAMs) favorecen el rescate del inhibidor aumentando la proporción de iniciador en el estado pre-translocacional (complejo N) (Meyer *et al.*, 1999, 2000; Mas *et al.*, 2002; Naeger *et al.*, 2002; Marchand y Gotte, 2003) (Figura 9).

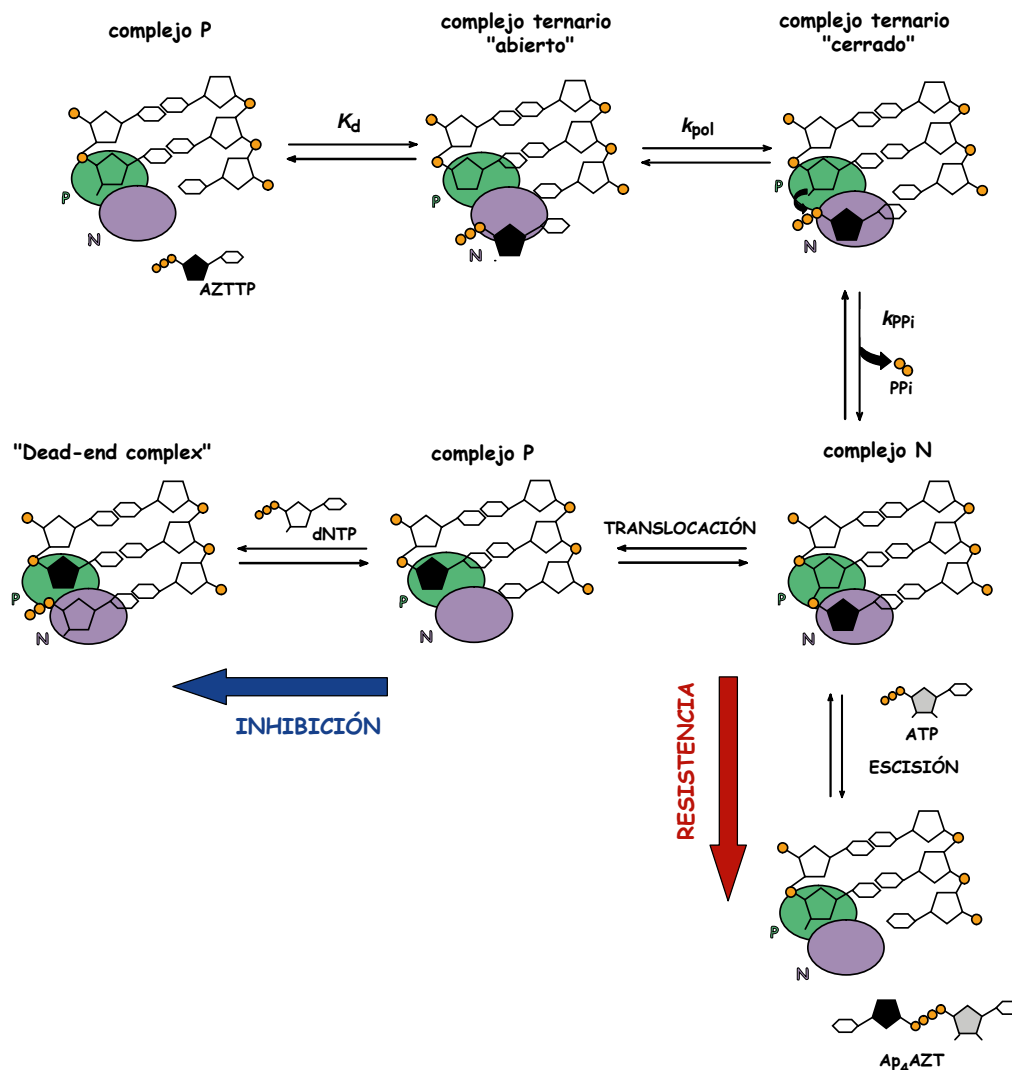


Figura 9. Esquema del mecanismo de la reacción de incorporación del AZTTP y el posterior equilibrio entre la inhibición de la polimerización y la escisión del AZTMP del extremo 3' del iniciador. La inhibición de la síntesis de DNA está favorecida cuando el AZTMP del extremo 3' del iniciador se encuentra en el sitio P y el siguiente dNTP complementario puede unirse para formar un “dead end complex”. Cuando el AZTMP está en el sitio N se encuentra favorecida la reacción de escisión.

El uso extensivo de inhibidores análogos a nucleósido en los tratamientos antirretrovirales ha facilitado la emergencia de variantes del VIH con inserciones y deleciones en el subdominio “fingers” de la RT (revisado en [Winters y Merigan, 2005](#); [Menéndez-Arias *et al.*, 2006](#); [Eggink *et al.*, 2007](#)). Estas inserciones y deleciones aparecen en pacientes tratados con gran variedad de fármacos. Normalmente aparecen acompañadas de otros muchos cambios relacionados con resistencia a NRTIs y NNRTIs. Las inserciones más comunes son las de dos aminoácidos entre las posiciones 69 y 70 (normalmente Ser-Ser, Ser-Ala y Ser-Gly), y suelen ir acompañadas del cambio T69S. Se ha mostrado que la inserción es clave para la adquisición, por parte de la RT, de una actividad fosforolítica dependiente de ATP, lo que le permite eliminar el AZTMP de iniciadores bloqueados por el fármaco en su extremo 3' ([Mas *et al.*, 2000](#)). Estudios posteriores confirmaron esto y revelaron que la inserción también presenta un efecto relevante en la escisión de iniciadores terminados con d4TMP, ddTMP, ddAMP y tenofovir monofosfato ([Mas *et al.*, 2002](#); [Meyer *et al.*, 2003a](#); [White *et al.*, 2004](#)). Las deleciones en el “ β 3- β 4 hairpin loop” también pueden influir en la resistencia a NRTIs. Por ejemplo, la delección del Asp-67 (Δ 67) en un contexto de secuencia que incluye las mutaciones M41L, K70R y T215Y aumenta la fosforólisis dependiente de ATP ([Boyer *et al.*, 2004](#); revisado en [Menéndez-Arias *et al.*, 2006](#)).

Otros factores que están asociados con el incremento de resistencia a AZT son la reducción de la actividad RNasa H por mutaciones tales como H539N o D549N ([Nikolenko *et al.*, 2005](#)), así como la aparición de mutaciones en el subdominio “connection” (E312Q, G333D, G335C/D, N348I, A360I/V, V365I y A376S) de RTs que presentan mutaciones de resistencia a análogos de timidina ([Nikolenko *et al.*, 2007](#); [Shannon *et al.*, 2007](#); [Yap *et al.*, 2007](#)).

Debido a que el mecanismo de escisión ha llegado a ser el dominante en la adquisición de resistencia a NRTIs, se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas focalizadas en la inhibición de esta reacción. Algunas de estas estrategias son: el uso de compuestos que interfieren con la unión del ATP ([Meyer *et al.*, 1998, 1999](#); [Ray *et al.*, 2003](#)), la utilización de análogos a dinucleótido tetrafosfatos, que son productos de la reacción de fosforólisis dependiente de ATP ([Meyer *et al.*, 2006](#); [Dharmasena *et al.*, 2007](#); revisado en [Sarafianos *et al.*, 2004](#)), o bien de análogos a PPi, como el foscarnet o los fofonoacetatos ([Cruchaga *et al.*, 2006](#)). El foscarnet se utiliza como inhibidor de la replicación de citomegalovirus (revisado en [De Clercq,](#)

2002). Mutaciones que confieren resistencia a foscarnet pueden suprimir la resistencia a AZT mediada por TAMs, posiblemente por una reducción de la escisión mediada por ATP (Tachedjian *et al.*, 1996; Arion *et al.*, 2000; Bazmi *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2003b; Marchand *et al.*, 2007). Otra posibilidad es desarrollar NRTIs que sean resistentes a la escisión. Son candidatos potenciales las metanocarbatimidinas (Boyer *et al.*, 2005), aunque presentan la desventaja de ser pobremente fosforiladas en células de mamíferos.

1.2.2 Inhibidores no análogos a nucleósido

Actualmente son cuatro los NNRTIs aprobados para su uso clínico: nevirapina (dipiridodiazepinona), delavirdina [bis(heteroacil)piperazina], efavirenz (benzoxazinona) y etravirina (4-[6-amino-5-bromo-2-(4-cianoanilino)pirimidin-4-iloxi]-3,5-dimetilbenzonitrilo) (Figura 6B). Estos inhibidores no necesitan activación metabólica intracelular para inhibir la replicación viral. Se unen a una región hidrofóbica localizada entre los subdominios “thumb” y “palm”, a unos 8-10 Å del centro activo de la enzima. Actúan de manera no competitiva, induciendo cambios en la estructura que rodea este bolsillo alostérico y modificando el posicionamiento del centro activo respecto al complejo molde-iniciador y al dNTP entrante. A diferencia de los NRTIs son altamente específicos para el VIH-1 y no son reconocidos por otras RTs y DNA o RNA polimerasas de origen viral o celular. Las mutaciones de resistencia asociadas a los NNRTIs afectan a residuos que intervienen estableciendo interacciones de tipo hidrofóbico o electrostático entre la enzima y el inhibidor, y afectan a residuos situados en las posiciones 98-108, 179-190 y 225-236 de p66, o a la Glu-138 de p51 (revisado en De Clercq, 1999; Menéndez-Arias, 2002a y Balzarini, 2004).

El mecanismo por el cual se produce la resistencia a estos compuestos implica la pérdida de las interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas que se establecen entre el compuesto y las cadenas laterales de los residuos de la RT en su sitio de unión, desestabilizando así la unión del inhibidor a la enzima (Spence *et al.*, 1996, Das *et al.*, 1996 y revisado en Balzarini, 2004). Ejemplos de estas mutaciones son Y181C, que confiere resistencia a nevirapina, y K103N, que confiere resistencia simultánea a los tres NNRTIs, nevirapina, delavirdina y efavirenz. Las mutaciones de la RT del VIH asociadas al uso de los NNRTIs se muestran en la Figura 7B.

1.3 Fidelidad de copia de la RT del VIH-1

El VIH-1 se caracteriza por presentar una alta heterogeneidad genética que da lugar a distribuciones complejas de genomas diferentes, pero genéticamente relacionadas, denominadas cuasiespecies (Eigen, 1971; revisado en: Domingo, 2003; Domingo *et al.*, 2006). A esta heterogeneidad contribuyen factores como el elevado tamaño de la progenie viral generada durante la infección (Coffin, 1995; Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995), así como, alta tasa de mutación y recombinación del virus (revisado en: Domingo y Holland, 1994; Domingo *et al.*, 1996; Mansky, 1998; Drosopoulos *et al.*, 1998). Esta alta tasa de mutación se debe principalmente a que la RT carece de actividad correctora de errores, a diferencia de lo que ocurre con otras polimerasas, de manera que durante el proceso de retrotranscripción puede incorporar y extender nucleótidos incorrectos (revisado en: Preston y Dougherty, 1996).

Esta diversidad genética hace al VIH-1 capaz de responder efectivamente a presiones selectivas, siendo responsable de la aparición de virus resistentes a fármacos antirretrovirales (revisado en: Richman, 1993; Larder *et al.*, 1994) y de mutantes de escape a la respuesta del sistema inmune del hospedador (Goudsmit *et al.*, 1991; Phillips *et al.*, 1991).

Se han realizado numerosos estudios en los que se ha tratado de determinar el papel que juegan distintos aminoácidos en la fidelidad de copia de RTs portadoras de mutaciones, utilizando ensayos de fidelidad en cultivos celulares y ensayos de fidelidad *in vitro* (genéticos y bioquímicos). Las estimaciones de la frecuencia de mutación determinadas en ensayos realizados *in vitro* se sitúan alrededor de 10^{-4} - 10^{-5} sustituciones por nucleótido. Este dato se considera una estimación aproximada, ya que depende, entre otros factores, de las condiciones del ensayo (pH, concentración de nucleótidos trifosfato, etc...), así como del tipo de molde (RNA o DNA, y su carácter homopolimérico o heteropolimérico) y del contexto de secuencia (revisado en: Preston y Dougherty, 1996; Menéndez-Arias, 2002b; Svarovskaia *et al.*, 2003). Por otro lado, las medidas de la tasa de mutación de la RT del VIH-1 obtenidas en cultivos celulares se encuentran en torno a 10^{-5} mutaciones por par de bases y por ciclo de replicación. Estos resultados sugieren que existen factores virales y/o celulares, que modulan la fidelidad de la RT del VIH-1 (Mansky y Temin, 1995; Mansky, 1998; Mansky y Bernard, 2000; Mansky *et al.*, 2003).

La tasa de error descrita para la RT del VIH-1 es superior a la observada en otras RTs, como las del virus Moloney de la leucemia de ratón (Mo-MLV) o del virus de la mieloblastosis de aves (AMV) (Bakhanashvili y Hizi 1992; revisado en Menéndez-Arias, 2002b).

Teniendo en cuenta que la elevada diversidad genética del VIH-1 es debida principalmente a la elevada tasa de error descrita para la RT, las variaciones en la fidelidad de copia de esta enzima, pueden ser útiles en la terapia frente al SIDA. En teoría, un incremento de la fidelidad podría limitar la generación de nuevas variantes virales, y retrasaría la aparición de mutantes resistentes a fármacos antirretrovirales (Wainberg *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha propuesto un modelo teórico que sugiere que es necesario un incremento muy significativo en la fidelidad de la polimerasa para que ésta tenga un impacto en la tasa de aparición de variantes virales (Coffin, 1995; Preston, 1997). Por otro lado, un aumento en la tasa de error de la RT podría producir una mayor acumulación de mutaciones, que al superar un determinado umbral, daría lugar a la pérdida de la información genética, promoviéndose la entrada del virus en un proceso denominado “catástrofe de error” (Eigen y Schuster, 1979; Domingo y Holland, 1994; Domingo *et al.*, 2005).

1.3.1 Tipos de ensayos de fidelidad

1.3.1.1 Ensayos basados en una única ronda de replicación

Estos ensayos se desarrollaron en un intento de entender mejor los procesos mutacionales implicados en la replicación viral. Se basan en el uso de un vector retroviral que contiene un gen marcador (p. ej.: *lacZ* α , timidina quinasa, neomicina) además de todos los elementos necesarios para que tenga lugar la transcripción de las proteínas virales, su encapsidación, y la síntesis del DNA proviral. Este vector, del que se han eliminado genes esenciales como *gag*, *pol*, *env*, y/o genes accesorios, se introduce en una línea celular empaquetadora que le proporciona estos genes en *trans*, y el virus producido se utiliza para infectar células diana. En estas células, el vector es capaz de completar una ronda de replicación y de integrarse en el genoma de la célula diana para formar provirus. Dado que es incapaz de expresar proteínas virales esenciales, no ocurren ciclos adicionales de replicación. Seleccionando un cultivo celular apropiado, se pueden detectar los fenotipos WT o mutante del gen marcador, y obtener así frecuencias de mutación. Una única ronda de replicación

implica una etapa de transcripción de RNA por la RNA polimerasa II, y una etapa de retrotranscripción que incluye la síntesis de DNA dependiente de RNA de la hebra (-) del DNA proviral, y la síntesis posterior de la hebra (+) del DNA proviral a través de la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA de la RT.

A pesar de que este tipo de ensayos presentan ciertas limitaciones, se considera que las tasas de error obtenidas representan la medida más fiable de las tasas de mutación retrovirales, ya que son determinaciones de errores ocurridos durante la polimerización en el contexto de un complejo de replicación compuesto por todas las proteínas virales en condiciones *in vivo*.

1.3.1.2 Ensayos bioquímicos

En este tipo de ensayos se utilizan RTs purificadas para la determinación de constantes cinéticas sobre un molde RNA o DNA, bajo unas condiciones determinadas (pH, concentración de sustrato, etc...). De esta manera se pueden obtener los parámetros cinéticos de la fidelidad de copia de DNA (dependiente de RNA o DNA) de la RT del VIH-1 y de sus mutantes, tanto en estado estacionario como preestacionario.

Los ensayos de incorporación errónea en el estado estacionario, se basan en la determinación de las constantes cinéticas (k_{cat} y K_m) para la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' de un iniciador y proporcionan una estimación de la selectividad de la RT por el nucleótido (Goodman *et al.*, 1993). La determinación de los parámetros cinéticos se lleva a cabo midiendo la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' del iniciador, previamente marcado en su extremo 5' con [$\gamma^{32}P$]ATP, en presencia de distintas concentraciones de dNTP, una vez formado el complejo binario RT/molde-iniciador. Los productos resultantes son analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los datos obtenidos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, y los parámetros k_{cat} (tasa de incorporación) y K_m (constante de Michaelis-Menten) son determinados para los nucleótidos correctos e incorrectos (Figura 10A). En principio, la tasa de incorporación (k_{cat}) debería ser mayor para el nucleótido correcto que para el incorrecto. Sin embargo, los nucleótidos incorrectos se unirán con menor afinidad al complejo RT/molde-iniciador que los nucleótidos correctos y presentarán, por tanto, un valor mayor de K_m . La eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) se define como la relación entre la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) obtenida para el nucleótido incorrecto y la eficacia catalítica obtenida para el nucleótido correcto. Así,

una mayor fidelidad de la polimerasa implica una menor eficiencia de incorporación errónea.

Para que se produzca la fijación de un error en el DNA nascente, no es suficiente la incorporación de un nucleótido incorrecto, la RT debe ser capaz además, de elongar el extremo desapareado que se genera como consecuencia de esta incorporación errónea. Esta medida de fidelidad se lleva a cabo mediante ensayos de extensión de extremos desapareados. En estos ensayos se calculan las constantes cinéticas en estado estacionario para la incorporación de un nucleótido correcto sobre dos tipos de complejo molde-iniciador: el complejo con el extremo 3' correctamente apareado y el mismo complejo con el extremo 3' desapareado. La eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) se define como la relación entre $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ obtenida para la extensión del extremo desapareado y la obtenida para la extensión del extremo correctamente apareado (Mendelman *et al.*, 1990; Goodman *et al.*, 1993). Se ha demostrado, que esta definición de eficiencia de extensión de extremos desapareados, sólo es válida si los valores de la constante de equilibrio de unión de la polimerasa a los complejos molde-iniciador, con el extremo 3' correctamente apareado y con el extremo 3' desapareado, son similares (Creighton *et al.*, 1992; Goodman *et al.*, 1993; Zinnen *et al.*, 1994).

Una de las limitaciones que presenta la interpretación de los datos proporcionados por los ensayos bioquímicos en el estado estacionario radica en que no es posible sacar conclusiones mecanísticas acerca de la base molecular que explicaría diferencias de fidelidad entre unas enzimas y otras. En los ensayos realizados en fase estacionaria, los valores de k_{cat} y K_{m} obtenidos dependen de la disociación entre la enzima y el complejo molde-iniciador (k_{off}). Por lo tanto, los valores de k_{cat} y de "afinidad" por el nucleótido (K_{m} aparente) podrían no ser reales. Por esta razón, se realizan medidas de fidelidad mediante los ensayos cinéticos en el estado preestacionario. Estos ensayos examinan la capacidad de la polimerasa para unirse e incorporar el dNTP a tiempos muy cortos (milisegundos). De esta forma, es posible el cálculo de la constante de afinidad (K_{d}) para la interacción entre el dNTP y el complejo binario RT/molde-iniciador, y de la constante de polimerización (k_{pol}) (Echols y Goodman, 1991; Johnson, 1993; Zinnen *et al.*, 1994). La eficiencia de incorporación errónea y de extensión de extremos desapareados se determina mediante la relación $k_{\text{pol}}/K_{\text{d}}$ (Kati *et al.*, 1992) (Figura 10B).

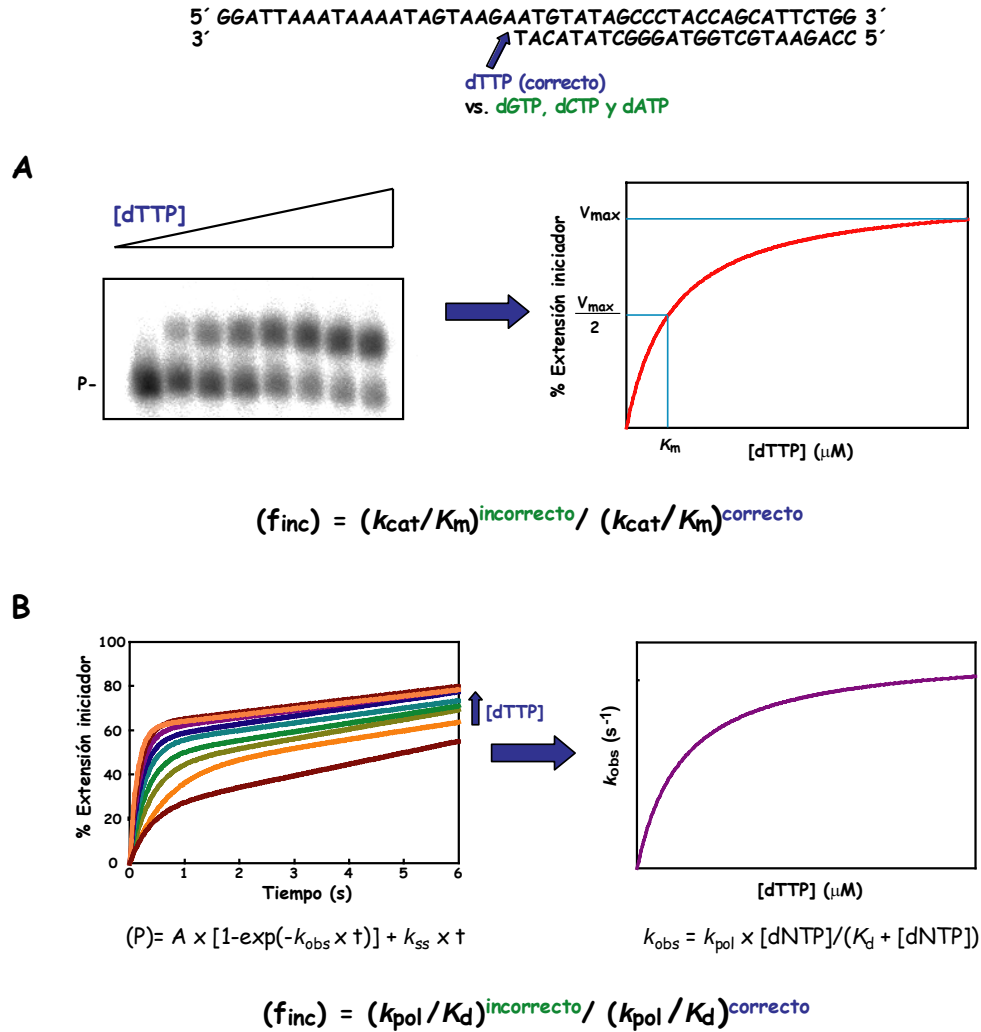


Figura 10. Determinación de la fidelidad de copia mediante ensayos cinéticos de incorporación errónea de nucleótidos sobre un complejo molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico, en estado estacionario (A) y en estado preestacionario (B). Se muestra un ejemplo en el que se mide la incorporación del nucleótido correcto, dTTP, en este caso. **(A)** En el estado estacionario, los productos de las reacciones obtenidos a concentraciones crecientes de dTTP (gel de la figura) son densitometradas obteniéndose el porcentaje del iniciador elongado en la posición +1 para cada valor de concentración de sustrato. Los valores de los porcentajes de extensión del iniciador para cada concentración de nucleótido en el ensayo, se ajustan a una curva de Michaelis-Menten (gráfica de la figura), de la cual se obtienen los valores de las constantes catalíticas, k_{cat} y K_m , para el nucleótido y la enzima en estudio. $k_{cat} = V_{max} / [E]$, donde $[E]$ es la concentración de enzima activa utilizada en el ensayo. La eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) se obtiene mediante el cociente de la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) del nucleótido incorrecto respecto a la del correcto. **(B)** En el estado preestacionario, los productos elongados obtenidos de las reacciones a concentraciones crecientes de dTTP (gráfica de la izquierda), se ajustan a la ecuación de la izquierda, donde A es la amplitud, k_{obs} es la constante aparente de formación del enlace fosfodiéster y k_{ss} es la tasa de recambio de la enzima. La dependencia de k_{obs} con la concentración de dNTP viene dada por la ecuación hiperbólica de la derecha, donde k_{pol} y K_d son las constantes catalítica y de afinidad para la incorporación del dNTP, respectivamente. La eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) se obtiene de la misma manera que en el estado estacionario, pero usando el cociente k_{pol}/K_d para el nucleótido incorrecto respecto al del correcto.

1.3.1.3 Ensayos genéticos

A pesar de que los ensayos bioquímicos proporcionan medidas exactas de la selectividad de la polimerasa por un nucleótido en una posición determinada, estos

ensayos resultan largos y tediosos, y el análisis se ve limitado a un número relativamente pequeño de sitios de incorporación, además de no poder detectarse otro tipo de errores como deleciones o inserciones. Los ensayos genéticos son una alternativa para obtener estimaciones de fidelidad utilizando moldes RNA y DNA y explorar una gran variedad de contextos de secuencia.

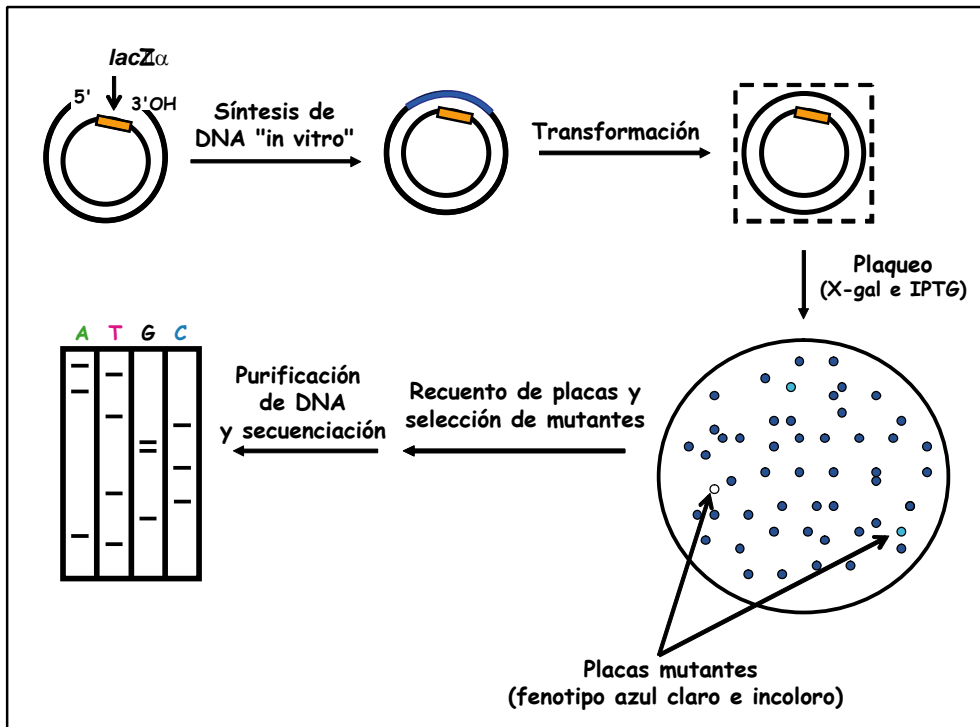


Figura 11. Esquema general de los ensayos *in vitro* de tipo genético (adaptado de Bebenek y Kunkel, 1995). El extremo 3'OH del iniciador corresponde a la posición +192 del genoma del fago M13, resultando la posición +1 el primer nucleótido transcrito del gen *lacZ*. En naranja se representa la secuencia de DNA correspondiente al molde de la reacción, gen *lacZ*, y en azul el DNA sintetizado por la enzima cuya fidelidad se encuentra en estudio. El cuadrado con líneas discontinuas, representa una célula de *E. coli* competente y con una actividad β -galactosidasa deficiente.

Los ensayos genéticos más utilizados, denominados "forward mutation assays", se suelen llevar a cabo usando como molde-iniciador de la reacción de síntesis de DNA, el DNA bicatenario del fago M13mp2, del cual se ha eliminado la zona correspondiente al gen *lacZ* de una de las hebras. La reacción de síntesis de DNA se realiza en presencia de la RT y de concentraciones altas de los cuatro dNTPs. Tras la transformación bacteriana con el producto de la reacción, los mutantes se identifican como placas azules/blancas en medio de cultivo que contiene X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactopiranósido) e IPTG (isopropil- β -tio-galactopiranósido). De este modo, si en la reacción de síntesis de DNA no se producen errores, el resultado es una placa azul oscuro. Por el contrario, la introducción de uno o varios errores implica la pérdida

parcial o total de la α -complementación, lo que se traduce en placas azul claro o blancas. El DNA recuperado de estas placas se secuencía, para determinar exactamente el número, el tipo y la posición en el genoma de las mutaciones introducidas por la RT (Figura 11) (Bebenek y Kunkel, 1995).

Otro tipo de ensayos genéticos son los ensayos de reversión. Estos ensayos se basan en el uso de moldes que contienen una mutación inactivante (normalmente codones de terminación o inserciones de un nucleótido). La reversión de la mutación se traduce en la corrección del error y por lo tanto en la restauración de la actividad del gen marcador (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988; Kunkel y Soni, 1988; Weber *et al.*, 1989).

1.3.2 Fidelidad de copia de mutantes de la RT del VIH-1

Durante los últimos años, han sido muchos los estudios realizados sobre la fidelidad de copia de RTs portadoras de cambios introducidos por mutagénesis dirigida (Tabla 3). La mayor parte de las sustituciones estudiadas afectan a residuos que forman parte de sitio de unión del dNTP, como Lys-65, Arg-72, Tyr-115, Gln-151 y Met-184. Así, los cambios K65R, Q151N, M184I, M184V y M184L producen un ligero aumento de la fidelidad de copia de la RT (Bakhanashvili *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1996; Wainberg *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997; Rubinek *et al.*, 1997; Drosopoulos y Prasad, 1998; Harris *et al.*, 1998a; Kaushik *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000, 2002, 2004). Algunos de estos cambios aparecen durante el tratamiento con fármacos antirretrovirales. Por ejemplo, K65R aparece en la RT de virus aislados de individuos tratados con ddC, ddI, abacavir o tenofovir; y M184V/I aparece durante el tratamiento con 3TC y otros análogos a nucleósido (revisado en Menéndez-Arias y Domingo, 2007). Sin embargo, el significado clínico de estos aumentos de fidelidad de copia no parece ser determinante para el tratamiento antirretroviral (Keulen *et al.*, 1997; Jonckheere *et al.*, 1998). Por otro lado, cambios no conservativos de la Tyr-115, además de las sustituciones R72A y M184A producen una disminución de la fidelidad de copia de la RT (Martín-Hernández *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1996; Martín-Hernández *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 1999; Cases-González *et al.*, 2000).

La fidelidad de copia de las RTs no depende exclusivamente de la arquitectura del sitio de unión de dNTP. Otro factor importante son las interacciones con el complejo molde-iniciador. Así, cambios en aminoácidos que interaccionan con el

extremo 5' desapareado del molde, como D76V y R78A producen un aumento en la fidelidad de copia (Kim *et al.*, 1998, 1999). En el caso de residuos que interaccionan con el iniciador, se ha observado que el cambio Y183F (que interacciona con el nucleótido 3' terminal del iniciador) produce una ligera disminución de la fidelidad de copia, que va acompañada de un descenso en la procesividad de la enzima (Harris *et al.*, 1998a). El mismo efecto, disminución de la fidelidad de copia, pero sin modificación de la eficacia catalítica de la RT se produce con el mutante M230I (Gutiérrez-Rivas y Menéndez-Arias, 2001). La cadena lateral de la Met-230 interacciona con el residuo de ribosa -2 del iniciador.

Por otro lado, cambios en posiciones más alejadas del centro activo, como las correspondientes a los residuos Gly-262 y Trp-266 que forman parte de la α -hélice H que interacciona con el complejo molde-iniciador en el subdominio "thumb" de la RT, provoca una disminución de la fidelidad de copia al aumentar la frecuencia de inserciones o deleciones durante la síntesis de DNA (Beard *et al.*, 1994; Bebenek *et al.*, 1995).

En la [Tabla 3](#) se muestra un resumen de los estudios de sustituciones de aminoácidos relacionados con fidelidad. En algunos casos se observa que para un mismo mutante, como por ejemplo en el caso de E89G, el efecto de fidelidad obtenido mediante los distintos tipos de ensayos resulta heterogéneo. No obstante, para determinados mutantes como por ejemplo Q151N, Y115A, R78A y D76V, hay consistencia entre los efectos de fidelidad obtenidos con los distintos tipos de ensayos.

En general, los cambios introducidos en el subdominio "fingers", producen aumentos en la fidelidad de copia de las RTs que los portan y más concretamente los que afectan a residuos localizados en la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ y que interaccionan con el extremo 5' desapareado del molde, por ejemplo L74V, D76I, D76R, D76V y R78A (Rubinek *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998, 1999; Shah *et al.*, 2000). En algunos casos se han observado aumentos de hasta 9 veces en la fidelidad de copia de la RT, como en el caso de D76V y R78A, en determinaciones llevadas a cabo con ensayos de tipo genético (Kim *et al.*, 1999). Sin embargo, estos mutantes son relativamente poco eficaces desde un punto de vista catalítico. Así, el mutante R78A tiene muy baja procesividad en presencia de moldes RNA y DNA, debido en parte a su elevada constante de disociación para complejos RNA-DNA y DNA-DNA (Kim *et al.*, 1999).

Tabla 3. Efectos de las sustituciones de aminoácidos sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1, estimada mediante distintos tipos de ensayos.

MUTACIÓN ^a	DESCRIPCIÓN ^b	INFLUENCIA EN FIDELIDAD ^c			REF. ^d
		Ensayos de una única ronda de replicación	Ensayos Bioquímicos	Ensayos Genéticos	
W24G (p66) ^e	<i>Fingers</i>	ND	↑	ND	(1)
W24G (p66)/F61G (p66) ^e	<i>Fingers</i>	ND	↓	ND	(1)
F61G (p66) ^e	<i>Fingers</i>	ND	≈	ND	(1)
F61A	<i>Fingers</i>	ND	ND	↑	(2)
K65R	<i>Fingers</i> / Unión dNTP / ddi ^R	↑	ND	↑	(3, 4)
Δ 65-69 ^f	<i>Fingers</i> / Unión dNTP	ND	ND	↑	(5)
D67N	<i>Fingers</i>	≈	ND	ND	(3)
K70R	<i>Fingers</i>	≈	ND	ND	(3)
R72A	<i>Fingers</i>	ND	↓/↑	↑	(6)
L74V	<i>Fingers</i>	≈	↑	≈	(3, 4, 6-8)
D76V	<i>Fingers</i>	↑	↑	↑	(3, 9)
R78A	<i>Fingers</i>	↑	ND	↑	(3, 10)
E89G	<i>Fingers</i> / Foscarnet ^R	≈	↓/↑	≈	(3, 7, 8) / (11-13)
E89G/M184V	<i>Fingers</i> / 3TC ^R	ND	↓	≈	(11, 12)
T69S/Inserción/TAMs ^g	<i>Fingers</i> / AZT ^R	ND	ND	↑	(14)
A114S, A114G	<i>Palm</i> / Unión dNTP	ND	≈	≈	(15)
Y115A	<i>Palm</i> / Unión dNTP	↓	↓	↓	(3, 7) / (17-19)
Y115F, Y115V	<i>Palm</i> / Unión dNTP	ND	↓	≈	(16-19)
Y115L, Y115I, Y115N, Y115M, Y115H, Y115G, Y115C, Y115S, Y115W	<i>Palm</i> / Unión dNTP	ND	↓	ND	(17-19)
V148I	<i>Fingers</i>	↑	ND	↑	(20)
Q151M	<i>Palm</i> / Unión dNTP / Múltiples NRTIs ^R	ND	≈	≈	(11, 21, 22)
Q151N	<i>Palm</i> / Unión dNTP	↑	↑	↑	(3, 23, 24)
A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M	<i>Fingers-Palm</i> / Múltiples NRTIs ^R	ND	ND	≈	(21)
K154A	<i>Palm</i>	≈	ND	≈	(3, 24)
F160Y, F160W	<i>Palm</i>	ND	≈	ND	(25)
Y183F	<i>Palm</i> / YMDD	ND	↑	≈	(26)
M184V	<i>Palm</i> / YMDD / 3TC ^R	≈	↓/↑	≈	(7, 11, 12)/(27-32)
M184I	<i>Palm</i> / YMDD / 3TC ^R	ND	↑	↑	(27, 33, 34)
M184A	<i>Palm</i> / YMDD	ND	↓	ND	(30)
M184L	<i>Palm</i> / YMDD	ND	↑	ND	(26)
T215Y	<i>Palm</i> / AZT ^R	≈	ND	ND	(32)
M41L/T215Y	<i>Fingers-Palm</i> / AZT ^R	↓	ND	ND	(32)
M41L/D67N/K70R/T215Y	<i>Fingers-Palm</i> / AZT ^R	↓	ND	ND	(32)
F227A	<i>Palm</i> / "Primer Grip"	≈	≈	ND	(3, 35)
W229A	<i>Palm</i> / "Primer Grip"	≈	↑	ND	(3, 35)
M230L	<i>Palm</i> / "Primer Grip"	ND	ND	↓	(36)
M230I	<i>Palm</i> / "Primer Grip"	ND	↓	↓	(19, 36)
M230I/ Y115W	<i>Palm</i> / "Primer Grip" / Unión dNTP	ND	≈	ND	(19)
G262A, W266A, Q269A	<i>Thumb</i>	ND	ND	↓	(37, 38)
D256A, Q258A, K259A, L260A, K263A	<i>Thumb</i>	ND	ND	≈	(38)
R277A, Q278A, L279A, C280A, K281A, L282A, R284A, G285A, K287A	<i>Thumb</i>	ND	ND	≈	(39)
Y501W	RNasa H	↓	ND	ND	(3)
I505A	RNasa H	≈	ND	ND	(3)

^a Se indica la mutación o mutaciones presentes en las RTs que han sido analizadas..

^b Se indica el dominio o subdominio donde se encuentra la mutación, según Arts y Wainberg (1996), la actividad en la que participa el residuo y/o la relación que tiene con la resistencia a antirretrovirales. AZT^R, 3TC^R, ddI^R, Foscarnet^R, y Múltiples NRTIs^R indican que esa mutación confiere resistencia a zidovudina, lamivudina, didanosina, foscarnet, y a múltiples inhibidores análogos a nucleósido, respectivamente.

^c El símbolo “▲” indica un incremento de fidelidad superior a 2 veces respecto a la de la RT WT; el símbolo “▼” indica una disminución de fidelidad superior a 2 veces respecto a la de la RT WT; el símbolo “≈” indica que no se ve alterada la fidelidad de la enzima, o que las diferencias son inferiores a 2 veces.

^d Referencias: (1) Agopian *et al.*, 2007; (2) Fisher y Prasad, 2002; (3) Mansky *et al.*, 2003; (4) Shah *et al.*, 2000; (5) Garforth *et al.*, 2007; (6) Lewis *et al.*, 1999; (7) Jonckheere *et al.*, 2000; (8) Rubinek *et al.*, 1997; (9) Kim *et al.*, 1998; (10) Kim *et al.*, 1999; (11) Drosopoulos y Prasad, 1998; (12) Hamburgh *et al.*, 1998; (13) Drosopoulos y Prasad, 1996; (14) Curr *et al.*, 2006; (15) Cases-González y Menéndez-Arias, 2005; (16) Boyer y Hughes, 2000; (17) Martín-Hernández *et al.*, 1996; (18) Martín-Hernández *et al.*, 1997; (19) Gutiérrez-Rivas y Menéndez-Arias, 2001; (20) Weiss *et al.*, 2004; (21) Rezende *et al.*, 1998a; (22) Kaushik *et al.*, 2000; (23) Weiss *et al.*, 2002; (24) Weiss *et al.*, 2000; (25) Gutiérrez-Rivas *et al.*, 1999; (26) Bakhanashvili *et al.*, 1996; (27) Hsu *et al.*, 1997; (28) Oude Essink *et al.*, 1997; (29) Wainberg *et al.*, 1996; (30) Pandey *et al.*, 1996; (31) Feng y Anderson, 1999; (32) Mansky *et al.*, 2000; (33) Rezende *et al.*, 1998b; (34) Oude Essink *et al.*, 1999; (35) Wisniewski *et al.*, 1999; (36) Cases-González y Menéndez-Arias, 2005; (37) Bebenek *et al.*, 1995; (38) Beard *et al.*, 1994; (39) Beard *et al.*, 1996;

^e Estas mutaciones se introdujeron solamente en las subunidad p66. Cuando se encuentran presentes en la subunidad p51, dan lugar a enzimas sin actividad polimerasa ya que impiden la dimerización de la RT.

^f Delección de 5 aminoácidos entre los residuos Lys-65 y Thr-69 (residuos que forman la denominada horquilla β3-β4)

^g Presentan un aumento de fidelidad los mutantes con el cambio T69S junto con una inserción de dos aminoácidos entre los codones 69 y 70, que puede ser Ser-Ser, Ser-Ala, Ser-Gly. Cuando a estos mutantes les acompañan las TAMs: A62V/L210W/R211K/L214F/T215Y o M41L/L210W/R211K/L214F/T215Y, la fidelidad de estas enzimas es mayor que la de la RT WT.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Los objetivos que nos hemos planteado en esta Tesis Doctoral han sido:

1. La determinación de las mutaciones asociadas a inserciones en el subdominio “fingers” de la RT del VIH-1, que resulten clave para la adquisición de resistencia a análogos a nucleósido (especialmente, zidovudina y estavudina), a través de un mecanismo de escisión dependiente de un donador de pirofosfato.
2. La búsqueda de nuevos compuestos que actúen como inhibidores de la reacción de escisión.
3. El estudio del papel de la Val-75 en la fidelidad de copia de la RT del VIH-1.

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Clonación de la región codificante de las RTs BH10 y SS en el plásmido pRT66B

Para la realización de este trabajo se han utilizado RTs que provienen de la cepa BH10 y del aislado SS, ambos del VIH-1, subtipo B. La cepa BH10 es una cepa WT, mientras que el aislado SS se obtuvo de un paciente en el que fracasó el tratamiento antirretroviral. El virus procedente del aislado SS contenía una RT con una inserción de dos serinas entre los codones 69 y 70, además de 43 cambios de aminoácido respecto a la RT presente en la cepa BH10. Al menos 9 de estos cambios estaban relacionados con resistencia a inhibidores de la RT (M41L, A62V, T69S, K70R, V118I, M184I, L210W, T215Y y G333E). Esta enzima se denominó RT SS (Figura 12) (Mas *et al.*, 2000).

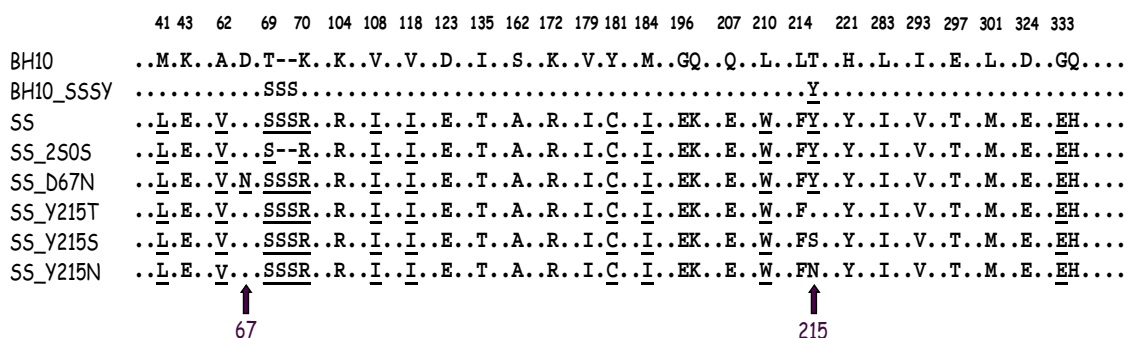


Figura 12. Diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los residuos 1 y 350 de la RT BH10, la RT SS y los mutantes analizados en este trabajo. Los residuos que son idénticos a la RT BH10 se representan mediante puntos. Los aminoácidos subrayados tienen que ver con resistencia a fármacos antirretrovirales.

En primer lugar, se introdujo un fragmento de DNA que codifica para una cola de 6 His en el extremo 3' de la región codificante de las RTs BH10 y SS, entre los sitios SalI y HindIII del plásmido pRT6 (Figura 13A). Para ello, se fosforilaron 25 pmol de los oligonucleótidos 5'-TCGACTCACCACCACCAC-CACTGATA-3' y 5'-AGCT-TATCAGTGGTGGTGG-TGGTGGTGAG-3' utilizando 10 U de la enzima polinucleótido quinasa de T4 (New England Biolabs) en 50 µl del tampón Tris-HCl 70 mM, pH 7,5, que contenía MgCl₂ 10 mM, ditiotretol (DTT) 5 mM y ATP 1 mM. La fosforilación se realizó a 37°C durante 60 min. Después se inactivó la polinucleótido quinasa de T4 mediante incubación de la muestra durante 10 min a 90°C. Una mezcla con 25 pmol de cada oligonucleótido fosforilado se calentó a 95°C durante 3 min y se dejó enfriar

lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. El híbrido formado presentó extremos compatibles con los que se obtuvieron después de la digestión de pRT6 con SalI y HindIII. La reacción de ligación del híbrido fosforilado y el plásmido digerido se llevó a cabo empleando DNA ligasa de T4 (New England Biolabs), en presencia del tampón suministrado por el fabricante. El producto de ligación se transformó en células competentes *E. coli* DH5 α [*F*⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*,) *U169*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r_K*⁻ *m_K*⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*].

Una vez introducida la región codificante para las 6 His, se cortó el plásmido pRT6 (Figura 13A) con las enzimas de restricción MscI y HindIII (New England Biolabs). El inserto de aproximadamente 1700 pb se purificó en un gel de agarosa al 0,8% en Tris-acetato 0,04 M/EDTA 2 mM (TAE), y se eluyó del gel utilizando el kit GeneCleanII (Bio 101 Inc.). Este fragmento de DNA de aproximadamente 1700 pb, se clonó posteriormente en los sitios MscI y HindIII del plásmido pRT66B (Figura 13B).

3.2 Mutagénesis dirigida

A lo largo de este trabajo se han introducido diversas mutaciones en la región codificante de las RTs de los aislados BH10 y SS del VIH-1 (subtipo B). La introducción de mutaciones en la región codificante de la RT viral se llevó a cabo mediante dos sistemas diferentes de mutagénesis *in vitro*. Para la obtención de la enzima SS_2S0S (RT con el contexto de secuencia de la RT SS en la que se ha eliminado la inserción) (Figura 12) (Mas *et al.*, 2000), se utilizó el sistema denominado “Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis System” de Promega, siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante, y basado en el método descrito por Zoller y Smith (1987).

El resto de las RTs mutantes se generaron usando el sistema de mutagénesis *in vitro* “QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene. Las mutaciones individuales Y215T, Y215N, Y215S y D67N se introdujeron en el plásmido pRT6 (Figura 13A), que contenía la región codificante de la subunidad de 66 kDa de la RT SS. Así, se obtuvieron las enzimas mutantes denominadas SS_Y215T, SS_Y215N, SS_Y215S y SS_D67N respectivamente (Figura 12). Además, la mutación T215Y se introdujo en un plásmido derivado de pRT6 que contenía la región codificante de una variante de la subunidad p66 de la RT BH10, en la que se había introducido el cambio

T69S más la inserción Ser-Ser entre los codones 69 y 70 (T69SSS) (Mas *et al.*, 2000). Al doble mutante obtenido se le denominó BH10_SSSY (Figura 12).

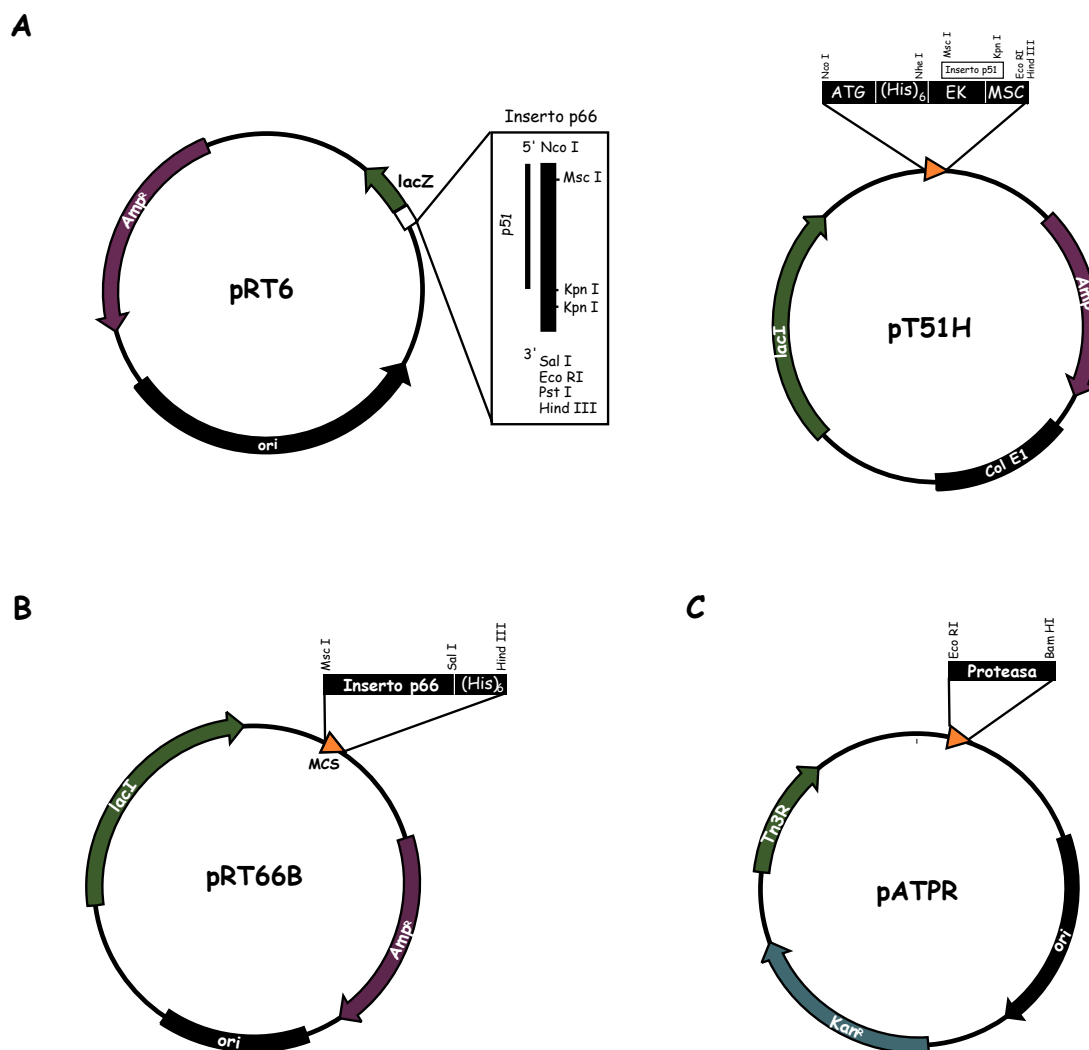


Figura 13. (A) Plásmidos utilizados para la mutagénesis y expresión de las subunidades p66 y p51 de la RT. El plásmido pRT6 es una construcción derivada del plásmido pUC12 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) al que se le introdujo una diana para la enzima de restricción NcoI (Hizi *et al.*, 1988), y en el que se insertó la región codificante de la p66 de la RT usando los sitios de restricción NcoI y EcoRI (Quiñones-Mateu *et al.*, 1997). El plásmido pT51H se construyó introduciendo en el plásmido comercial pTrcHisB (Invitrogen) entre los sitios NheI y EcoRI la región codificante de la p51 (Martín-Hernández *et al.*, 1996). Los sitios MscI y KpnI se encuentran dentro de la región codificante de p51 en la RT. **(B) Plásmido utilizado para la mutagénesis y expresión de la subunidad p66 de la RT.** El plásmido pRT66B (Boretto *et al.*, 2001) es una construcción derivada del plásmido pTrc99A (Amersham Bioscience) al que se le introdujo la región codificante de la p66 con una región codificante para 6 histidinas en su extremo 5', usando las dianas de restricción MscI y HindIII. **(C) Plásmido para la expresión de la proteasa.** El plásmido pATPR se construyó a partir del plásmido pAT (Boretto *et al.*, 2001) clonando el gen de la proteasa del VIH-1 precedida por el codón ATG y el sitio de unión de ribosomas (RBS) de T7g10, entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Este plásmido se coexpresa con el plásmido pRT66B representado en B para que se produzca el procesamiento de la p66 de la RT.

La abreviatura Amp^R indica la región codificante del gen de resistencia a ampicilina, Kan^R indica la región codificante del gen de resistencia a kanamicina, e (His)₆ indica la secuencia codificante para 6 histidinas.

Por otro lado, se generaron varios mutantes en la posición Val-75, introduciendo las mutaciones individuales V75A, V75F, V75I, V75L, V75M, V75S y V75T en el plásmido pRT6 que contenía la región codificante de la subunidad de 66 kDa de la RT BH10. A estos mutantes se les denominó BH10_V75A, BH10_V75F, BH10_V75I, BH10_V75L, BH10_V75M, BH10_V75S y BH10_V75T, respectivamente.

El método de mutagénesis dirigida “QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit” se basa en la utilización de un plásmido molde, que en este caso fue el vector de expresión pRT6, donde se introducen las mutaciones utilizando reacciones de amplificación por PCR y oligonucleótidos mutagénicos (Figura14).

La reacción de mutagénesis se llevó a cabo en 50 µl de un tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, que contenía KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, seroalbúmina bovina libre de nucleasa (BSA) 0,1 mg/ml, 125 ng de cada uno de los correspondientes oligonucleótidos mutagénicos, 5-50 ng de plásmido (pRT6), dNTPs a una concentración de 500 µM cada uno y 2,5 U de la DNA polimerasa Pfu Turbo (Stratagene). La amplificación se inició con una incubación de 30 s a 95°C seguida de 16 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C y 10 min a 68°C. El producto se trató a 37°C durante 1 hora con 10 U de la enzima de restricción DpnI (Stratagene). DpnI es una endonucleasa que actúa sobre DNA metilado o hemimetilado, lo que produce la degradación del molde DNA que se encuentra metilado al utilizarse plásmidos amplificados en una cepa *dam*⁺ de *E. coli*. De esta forma se obtienen únicamente las hebras sintetizadas *de novo* durante la reacción de amplificación y que contienen la mutación deseada

Se transformó 1 µl del producto de la reacción anterior en células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF' { $\Delta(mcrA)$ 183, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, *endA1*, *supE44*, *thi*⁻, *recA*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, λ ⁻, [*F'*, *proAB*, *lacI*^fZ Δ M15, *Tn10*, (*tet*^r)]}, y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina. A continuación, se identificaron las mutaciones mediante secuenciación del DNA plasmídico extraído con el kit “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por el Servicio de Secuenciación de la U.A.M. (Servicio Interdepartamental de Investigación, S.I.D.I., Parque Científico) utilizando el kit de secuenciación ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) y los secuenciadores automáticos ABI 377 DNA Sequencer o ABI 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Para el análisis de secuencias se utilizó el paquete Seqman 4.0

Mutación		Oligonucleótidos	
SS_Y215T	5'	GGAGGTGGGGATT <u>TACC</u> ACACCAGACAAA	3'
	3'	TCCACCCCTAA <u>ATGG</u> TGTGGTCTGTTT	5'
SS_Y215S	5'	GGAGGTGGGGATT <u>TCC</u> ACACCAGACAAA	3'
	3'	TCCACCCCTAA <u>AGG</u> TGTGGTCTGTTT	5'
SS_Y215N	5'	GGAGGTGGGGATT <u>AAC</u> ACACCAGACAAA	3'
	3'	TCCACCCCTAA <u>TTG</u> TGTGGTCTGTTT	5'
SS_D67N	5'	GTCATAAAGAAAAA <u>AAT</u> AGTTCTAGTTCTAGATGGAG	3'
	3'	GTATTCTTTTTT <u>TTA</u> TCAAGATCAAGATC	5'
BH10_SSSY	5'	GAGGTGGGGACTT <u>TAC</u> ACACCAGACAAAAACATC	3'
	3'	CTCCACCCCTGA <u>ATG</u> TGTGGTCTGTTTGTAG	5'
BH10_V75A	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>ACA</u> GATTTCAGAGA	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>CGT</u> CTAAAGTCTCT	5'
BH10_V75F	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>TTG</u> GATTTCAGAGAAC	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>AAG</u> CTAAAGTCTCTTG	5'
BH10_V75I	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>ATA</u> GATTTCAGAGA	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>TAT</u> CTAAAGTCTCT	5'
BH10_V75L	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>CTA</u> GATTTCAGAGA	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>TGAT</u> CTAAAGTCTCT	5'
BH10_V75M	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>ATG</u> GATTTCAGAGAAC	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>TAC</u> CTAAAGTCTCTTG	5'
BH10_V75S	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>TCA</u> GATTTCAGAGAAC	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>TAG</u> TTAAAGTCTCTTG	5'
BH10_V75T	5'	CAGTACTAAATGGAGAAAATT <u>ACA</u> GATTTCAGAGAAC	3'
	3'	GTCATGATTACCTCTTTTAAT <u>TGT</u> CTAAAGTCTCTTG	5'

Figura 14. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de mutagénesis. En la columna de la izquierda se indican las mutaciones obtenidas, utilizando el código de una letra, de modo que se muestra el nombre del aminoácido en la secuencia de la RT, seguido de la posición y sustitución realizada. Delante de cada mutante se indica el contexto de secuencia en el que se encuentra la mutación. Los nucleótidos subrayados son los correspondientes a la mutación introducida en la región de la RT. Todas las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación. Para la introducción de dichas mutaciones se utilizaron dos oligonucleótidos, uno para la hebra sentido (5'→3') y otro para la antisentido (3'→5').

(DNASTar Inc.). Los DNAs que contenían las mutaciones correctas se transformaron en células competentes *E. coli* DH5 α [*F*⁻, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*,) *U169*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r*_K⁻ *m*_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*].

Posteriormente, el plásmido pRT6 se cortó con MscI y KpnI (New England Biolabs), liberando un inserto de 1207 pares de bases (pb) que, tras purificarse en un gel de agarosa al 0,8% en TAE, se extrajo mediante adsorción a una matriz de silicato con el kit GeneClean II (Bio 101 Inc.). Este inserto se clonó en los correspondientes sitios de restricción situados dentro de la región codificante de la p51, clonada en el vector pT51H (Figura 13A). Con el producto de ligación se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α .

Además, los cambios individuales V75A, V75F y V75I se introdujeron en el plásmido pRT66B (Figura 13B), que contenía la región codificante de la subunidad p66 de la RT BH10, construido como se explica en el apartado 3.1. El procedimiento de mutagénesis fue el mismo que el explicado anteriormente, a excepción del molde inicial en la amplificación, que fue pRT66B. Una vez introducidas las mutaciones se extrajo el DNA plasmídico mediante el kit “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega). Después de comprobar por secuenciación que las mutaciones introducidas eran correctas, el DNA se transformó en células competentes *E. coli* XL1-Blue PR. Las células *E. coli* XL1-Blue PR son células competentes *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pATPR (Figura 13C), que contiene la región codificante de la proteasa del VIH-1. Esta enzima es necesaria para que se produzca el procesamiento de la subunidad p66 de la RT (Boretto *et al.*, 2001).

3.3 Purificación de RTs

La purificación de las enzimas con los cambios introducidos se llevó a cabo por dos métodos diferentes: bien mediante la expresión individual de las dos subunidades de la RT (p66 y p51), o bien mediante la expresión de la subunidad p66, que posteriormente fue procesada por la proteasa del VIH-1 para dar lugar a la formación del heterodímero p66/p51.

3.3.1. Purificación mediante expresión individual de las dos subunidades de la RT

3.3.1.1. Expresión de las subunidades p66 y p51 de la RT

Ambas subunidades fueron expresadas por separado, creciéndose de forma independiente las bacterias portadoras de los plásmidos pRT6 y pT51H (Figura 13A) de la siguiente manera:

Expresión constitutiva de p66: Se prepararon 3 matraces Erlenmeyer conteniendo cada uno de ellos 1 litro de medio LB (bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l) con ampicilina a 100 µg/ml, que se inocularon con 10-20 µl de un cultivo reciente de bacterias *E. coli* DH5α portadoras del plásmido pRT6.

Expresión inducible de p51: Se inocularon 20 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/ml) con una pequeña alícuota de un cultivo reciente de bacterias *E. coli* DH5α, portadoras del plásmido pT51H.

Ambos cultivos se crecieron durante la noche a 37°C en agitación constante. Pasado este tiempo, se inocularon 200 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/ml) con 20 ml del cultivo crecido de bacterias portadoras de pT51H, y se dejó crecer hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,8-1,0. Se indujo entonces la expresión de p51 añadiendo isopropil-β-D-tio-galactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,6 mM. Al cabo de 60 min a 37°C, se combinó este cultivo con los crecidos durante la noche y en los que se expresa constitutivamente p66, y se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4°C en un rotor GS3 (Sorvall).

3.3.1.2 Lisis de las bacterias y formación del heterodímero

Las bacterias se resuspendieron en 100 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,8 conteniendo NaCl 0,3 M, y se incubaron a 4°C durante 5 min en presencia de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y lisozima 0,2 mg/ml. A continuación, se añadieron 40 ml de un tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, conteniendo NaCl 4 M para favorecer la disociación de posibles homodímeros p66/p66 y p51/p51. El extracto se sonicó a máxima potencia durante 5-8 min. Tras esta etapa, se eliminaron precipitados mediante centrifugación a 10000 rpm durante 15 min a 4°C en un rotor

SS-34 (Sorvall) y se incubó el sobrenadante a 37°C durante 30 min. Se favoreció la formación de los heterodímeros p66/p51 incubando la mezcla a 4°C durante 15 min. La disolución obtenida se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores. A continuación, se le añadió al sobrenadante tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, conteniendo NaCl 0,3 M, en cantidad suficiente como para disminuir la concentración de NaCl por debajo de 0,4 M. Posteriormente, se filtró la muestra a través de papel Whatman MM y se guardó a 4°C hasta su purificación por cromatografía de afinidad.

3.3.1.3 Cromatografía de afinidad

La muestra se aplicó en una columna de 1,5-2 ml de Ni²⁺-ácido nitriloacético-agarosa (ProBond™, Invitrogen) previamente equilibrada en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, conteniendo NaCl 0,3 M. A continuación, se lavó la columna con 100 ml del tampón de equilibrado, con 60 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0, que contenía NaCl 0,5 M y con 50 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0, conteniendo NaCl 0,5 M e imidazol 50 mM.

Tras los lavados, la RT se eluyó de la columna con un gradiente preparado con 20 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0, conteniendo NaCl 0,5 M e imidazol 50 mM y 20 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0, que contenía NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 M. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron alícuotas de 150 µl de cada fracción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (10-12% acrilamida). Las fracciones enriquecidas en las subunidades p66 y p51 se reunieron y dializaron frente a un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 25 mM, etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA) 1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 10% (tampón de diálisis estándar), utilizándose bolsas de diálisis de tipo Visking 20/32 de diámetro 16 mm (Serva).

3.3.1.4 Cromatografía de intercambio iónico

El contenido de la bolsa de diálisis se aplicó en su totalidad en una columna de aproximadamente 0,3 ml de Q-Sepharosa (GE Healthcare), previamente equilibrada en el tampón de diálisis estándar. A continuación, se equilibró una columna de 2 ml de Bio-Rex 70 (Bio-Rad) en el tampón de diálisis estándar y se aplicó la fracción no retenida de la columna anterior.

La columna de Bio-Rex 70 se lavó con 20 ml de tampón de diálisis estándar, eluyéndose la RT con un gradiente preparado con 25 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 25 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 10% y con 25 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 0,6 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 10%. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron alícuotas de distintas fracciones mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y SDS (10-12% acrilamida). Las fracciones en las que se observaron las bandas de p66 y p51, características de la RT, se reunieron y dializaron frente al tampón de diálisis.

Tras varios cambios del medio de diálisis, el contenido de la bolsa (15-25 ml aproximadamente) se concentró hasta un volumen inferior a 0,5 ml mediante centrifugación a 4°C en ciclos de 20 min, utilizando concentradores de tipo Centriprep-30 y Centricon-30 (Amicon) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las preparaciones concentradas de RT se almacenaron a -20°C.

3.3.1.5 Comprobación de la pureza y la concentración de la enzima obtenida

La determinación de la pureza de la proteína obtenida se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (Laemmli, 1970). La concentración de proteína se determinó utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA).

3.3.2 Purificación de RTs mediante la expresión de la subunidad p66 y su posterior procesamiento.

3.3.2.1. Expresión de la subunidad p66 de la RT

Se inocularon 10 µl de un cultivo reciente de bacterias *E. coli* XL1-Blue PR portadoras de los plásmidos pRT66B (Figura 13B) y pATPR (Figura 13C) en 20 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Este cultivo se dejó toda la noche a 37°C en agitación constante. Los 20 ml de cultivo se añadieron a 300 ml de LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se continuó la incubación a 37°C durante 4 horas más. Pasado este tiempo, se prepararon 3 matraces que contenían 1 litro de medio LB/ampicilina (100 µg/ml)/kanamicina (50 µg/ml), y a cada uno de ellos se le añadieron 100 ml del cultivo anterior. Una vez alcanzada la densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8, se añadió IPTG a una concentración final de 0,6 mM y se mantuvo la incubación a 37°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4°C, utilizando un rotor GS3 (Sorvall).

3.3.2.2 Lisis de las bacterias

Cada gramo de células se resuspendió en 2 ml de tampón Tris/HCl 40 mM pH 8,0 conteniendo EDTA 25 mM, sacarosa al 10%, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM y lisozima 1 mg/ml. Después de una incubación a 4°C en agitación constante durante 15 min se añadió el mismo volumen de un tampón que contenía NP-40 al 0,8%, DTT 20 mM, PMSF 1 mM y benzamidina 2 mM y se volvió a incubar 15 min en agitación a 4°C. Pasado este tiempo se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M y se sonicó la muestra durante 1 min. A continuación, dicha muestra se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, utilizando un rotor SS-34 (Sorvall). El sobrenadante se diluyó 7 veces con tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,8 y se guardó a 4°C hasta su purificación.

3.3.2.3 Cromatografía de intercambio iónico

En primer lugar se preparó la columna de celulosa fosfato (Whatman) según las indicaciones del fabricante y se equilibró con tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,8 hasta que se alcanzó un pH de 6,0. Una vez equilibrada la columna, se pasó la muestra y se lavó con 10 volúmenes de tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,8.

Finalmente, la enzima se eluyó con un gradiente preparado con 25 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 30 mM, y con 25 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, que contenía NaCl 1 M. Se recogieron fracciones de 2 ml, se midió su absorbancia a 280 nm y se analizó una muestra de cada fracción en un gel de poliacrilamida y SDS (10-12 % acrilamida) para detectar las dos subunidades: p66 y p51. Se juntaron aquellas fracciones en las que se encontró proteína y en las cuales la proporción de ambas subunidades era de aproximadamente 1:1.

3.3.2.4 Cromatografía de afinidad

La muestra obtenida de la columna anterior se aplicó en una columna de 1,5-2 ml de Ni²⁺-ácido nitriloacético-agarosa (ProBond™, Invitrogen) previamente equilibrada en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, que contenía NaCl 0,3 M. Los lavados de la

columna y la elución de la proteína se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.3.1.3.

Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron alícuotas de 15 μ l de cada fracción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (10-12 % acrilamida). Las fracciones enriquecidas en las subunidades p66 y p51 se reunieron y dializaron frente al tampón de diálisis estándar, utilizándose bolsas de diálisis de tipo Visking 20/32 de diámetro 16 mm (Serva).

Tras cuatro cambios del medio de diálisis, la muestra (15-25 ml aproximadamente) se concentró hasta un volumen inferior a 1 ml mediante centrifugación a 4°C en ciclos de 20 min, utilizando concentradores de tipo Centriprep-30 y Centricon-30 (Amicon), y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las preparaciones concentradas de RT se almacenaron a -20°C.

3.3.2.5 Comprobación de la pureza y la concentración de la enzima obtenida

La determinación de la pureza de la proteína obtenida se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS. La concentración de proteína se determinó en base al coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon_{280} = 260450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de la RT (Kati *et al.*, 1992).

3.4 Preparación de complejos DNA/DNA heteropoliméricos

Los complejos molde-iniciador DNA/DNA heteropoliméricos utilizados en este trabajo se detallan en la Figura 15. Los oligonucleótidos de DNA fueron suministrados por Invitrogen Life Technologies. Todos ellos (purificados por HPLC) presentaron un alto grado de pureza.

Los iniciadores se marcaron en el extremo 5' con 1 μ Ci de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (10 mCi/ml, GE Healthcare) y 5 U de polinucleótido quinasa de T4 (Promega). La reacción de marcaje de los iniciadores se realizó en presencia de un tampón Tris-HCl 70 mM, pH 7,5 que contenía MgCl_2 10 mM y DTT 5 mM. Tras incubar durante 45 min a 37°C, se verificó la incorporación de fósforo radiactivo al oligonucleótido mediante cromatografía en placas de PEI-celulosa (TLC, 20x20 cm; Merck), utilizando para su

separación fosfato bisódico 0,5 M. Posteriormente, se inactivó la polinucleótido quinasa mediante una incubación de 10 min a 90°C.

Los complejos molde-iniciador se hibridaron en una disolución de NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM, mediante incubación a 95°C durante 4 min y posterior enfriamiento lento hasta alcanzar temperatura ambiente. Previamente a su uso, todos estos complejos molde-iniciador se diluyeron a la concentración deseada en tampón HEPES 500 mM, pH 7,0 conteniendo NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM (concentraciones finales).

Nombre	Secuencia
D2-47 (47)	5' GGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGG 3'
PG5-25 (25)	3' *TACATATCGGGATGGTCGTAAGACC 5'
PG5-25C (25)	3' *CACATATCGGGATGGTCGTAAGACC 5'
PG5-25G (25)	3' *GACATATCGGGATGGTCGTAAGACC 5'
PG5-25A (25)	3' *AACATATCGGGATGGTCGTAAGACC 5'
31T (31)	5' TTTTTTTTTAGGATACATATGGTTAAAGTAT 3'
21P (21)	3' *CCTATGTATACCAATTTCATA 5'
21PT (21)	3' *TCTATGTATACCAATTTCATA 5'
21PG (21)	3' *GCTATGTATACCAATTTCATA 5'
21PA (21)	3' *ACTATGTATACCAATTTCATA 5'
D38 (38)	5' GGGTCCTTTCTTACCTGCAAGAATGTATAGCCCTACCA 3'
25PGA (25)	3' *GGACGTTCTTACATATCGGGATGGT 5'
M54 (54)	5' CCCATACAAAAGGAAACATGGGAAACATGGTGACAGAGTATTGGCAAGCCACA 3'
3TRP (22)	3' *CTGTCTCATAACCGTTCGGTGT 5'

Figura 15. Complejos heteropoliméricos utilizados en los distintos ensayos. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados como molde (en negrita) y los correspondientes iniciadores (situados inmediatamente debajo de éstos). **D2-47** es un oligonucleótido cuya secuencia incluye los nucleótidos 915 (extremo 5') a 961 (extremo 3') del gen *gag* del VIH-1 BH10 (número de acceso M15654 del GenBank). **M54** es un oligonucleótido cuya secuencia incluye los codones 547 a 564 de la RT del VIH-1.

En los estudios cinéticos llevados a cabo en el estado pre-estacionario para determinar la fidelidad de copia y en los ensayos de extensión en ausencia de un nucleótido, en los que se usó como cofactor Be^{2+} o Mn^{2+} , la hibridación de los complejos molde-iniciador correspondientes se realizó únicamente en presencia de agua, en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que se explicó

anteriormente. Los híbridos se prepararon a la concentración necesaria para ser usados en el ensayo.

3.5 Determinación de la concentración de enzima activa

La determinación de la concentración de enzima activa se realizó con todas las RTs y con el complejo molde-iniciador D2-47/PG5-25, el cual se preparó siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.4.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ l. Se incubó una mezcla preparada con 10 μ l de una disolución de RT (12 nM) y el híbrido correspondiente a una concentración 2X (60 nM) en tampón HEPES 100 mM, pH 7,0, que contenía acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 6000 al 5%, NaCl 30 mM y acetato magnésico 30 mM. Tras esta etapa de preincubación, se añadieron 10 μ l del nucleótido correcto a incorporar en la posición +1 del iniciador (dTTP), disuelto en una solución acuosa de acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%.

A los 10, 20, 30 y 40 s del inicio de las reacciones, se retiraron alícuotas de 4 μ l que se mezclaron con 4 μ l de solución de parada de la reacción [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y se incubaron durante 10 min a 90°C. Los productos de las reacciones se analizaron tras electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M.

Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado en un nucleótido y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm) usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH). Se representaron los valores correspondientes al porcentaje del iniciador total elongado a los distintos tiempos de incubación (10, 20, 30 y 40 s), ajustándose a una recta del tipo $y=ax+b$, donde y es el porcentaje de iniciador elongado, y x es el tiempo de reacción transcurrido. El parámetro b representa el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero. Este porcentaje multiplicado por la concentración de híbrido en el ensayo es igual a la concentración de enzima activa en el mismo.

3.6 Ensayos de bloqueo con inhibidores y posterior escisión y polimerización

En estos ensayos se analizó la capacidad de las enzimas para escindir un inhibidor (NRTI) del extremo 3' del iniciador. Se analizaron las RTs BH10, BH10_SSSY, SS, SS_2S0S, SS_D67N, SS_Y215T, SS_Y215S y SS_Y215N. Se utilizó el complejo heteropolimérico D38/25PGA que se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.

Para eliminar cualquier traza de PPi, todos los derivados trifosfato de los NRTIs, los dNTPs y rNTPs fueron tratados con pirofosfatasa (Roche) antes de ser usados. Ésta fue eliminada, después de una incubación de 1 hora a 37°C, mediante centrifugación a 4°C en ciclos de 20 min, utilizando concentradores de tipo Microcon-10 y Centricon-10 (Amicon).

La RT y el complejo molde-iniciador se mezclaron en 25 µl de un tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5% (tampón de preincubación) (Figura 16). La concentración de enzima activa en el ensayo fue de aproximadamente 12-24 nM y la concentración de complejo molde-iniciador fue de 30 nM.

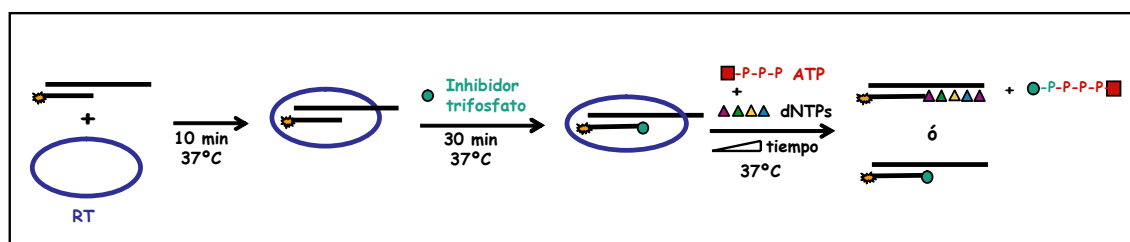


Figura 16. Esquema de la reacción de terminación con inhibidores y posterior escisión y polimerización. La reacción se inicia mediante la adición del inhibidor trifosfato a una mezcla que contiene la RT y el molde-iniciador, preincubada durante 10 min. Cuando el inhibidor se ha incorporado, se añade el donador de PPi (ATP, en este caso) y todos los dNTPs. Dependiendo de la capacidad de la enzima para rescatar el inhibidor se obtiene un producto elongado o no elongado.

Después de preincubar el complejo molde-iniciador con la enzima a 37°C durante 10 min, la reacción se inició añadiendo el mismo volumen (25 µl) de tampón de preincubación que contenía el inhibidor trifosfato a una concentración final de 25 µM. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 37°C. Una vez incorporado el inhibidor trifosfato en el extremo 3' del iniciador, se añadió tampón de preincubación

conteniendo una mezcla de todos los dNTPs a una concentración final de 100 μM y el donador de PPi a la concentración correspondiente dependiendo del ensayo. Debido a que el siguiente dNTP complementario (dATP en nuestro caso) presenta un efecto inhibitorio de la reacción de rescate, este dNTP se usó a una concentración final de 1 μM en estos experimentos. Así, se iniciaron las reacciones de rescate (escisión y posterior elongación) que se incubaron a 37°C y se detuvieron a distintos tiempos, entre 0 y 30 min, retirándose alícuotas de 4 μl que se mezclaron con 4 μl de solución de parada de la reacción y se incubaron posteriormente durante 10 min a 90°C. Los productos de las reacciones se analizaron tras electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M.

Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm) usando el programa Tina versión 2.09.

Se llevó a cabo una modificación de los ensayos anteriores para comprobar el efecto inhibitorio del dATP en la reacción de rescate. Para ello, las mezclas con el complejo molde-iniciador bloqueado con el inhibidor correspondiente se incubaron con concentraciones de dATP entre 1 y 800 μM durante un tiempo fijo de 3-15 min dependiendo del ensayo. En todos los casos los tiempos de incubación estuvieron dentro del rango lineal de la cinética correspondiente. La reacción se detuvo añadiendo 4 μl de solución de parada y calentando la muestra durante 10 min a 90°C. Los productos de la reacción se analizaron y cuantificaron como se ha explicado en el párrafo anterior. El porcentaje de inhibición fue representado frente a la concentración de dATP y los datos se ajustaron a una ecuación hiperbólica para obtener la concentración inhibidora al 50 (CI_{50}) para cada enzima.

3.7 Ensayos de retardo en gel

3.7.1 Bloqueo del iniciador con d4T-trifosfato (d4TTP)

En este ensayo el iniciador 25PGA (10 μM) se bloqueó en el extremo 3' con d4TTP (100 μM). Se llevó a cabo en un volumen de 40 μl usando 400 U de la enzima transferasa terminal (Roche) en tampón Tris-HCl 125 mM pH 6,6, conteniendo BSA

1,25 mg/ml, cacodilato potásico 1 M y MnCl_2 1 mM. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima calentando la muestra durante 10 min a 90°C.

A continuación, el iniciador bloqueado con el d4T (25PGA^{d4T}) se purificó en un gel de poliácridamida al 20% conteniendo urea 8 M. La muestra se eluyó del gel utilizando un tampón que contenía acetato amónico 0,5 M, acetato magnésico 10 mM y SDS al 0,1%. La concentración del iniciador purificado se determinó espectrofotométricamente (asumiendo un coeficiente de extinción molar a 260 nm (ϵ_{260}) de $3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

25PGA^{d4T} se marcó radiactivamente con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP en su extremo 5' y se hibridó con el molde D38 siguiendo el procedimiento que se explica en el apartado 3.4.

3.7.2 Determinación de la afinidad de la RT por el complejo molde-iniciador bloqueado en el extremo 3' con d4T.

Las constantes de disociación (K_d) de los complejos RT-DNA/DNA se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento descrito por [Astatke et al. \(1995\)](#). Se determinaron estos valores para las enzimas BH10, BH10_SSSY, SS, SS_2S0S, SS_Y215T, SS_Y215S y SS_Y215N.

El complejo molde-iniciador bloqueado con d4T (D38/25PGA^{d4T}) se incubó a una concentración de 0,3 nM con concentraciones de enzima activa entre 0,625 y 40 nM en un volumen total de 10 μl de tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%. Después de la incubación durante 10 min a 37°C, las muestras se analizaron en un gel de poliácridamida no desnaturante al 6%, en tampón TB (Tris-borato 85 mM, pH 8,0).

Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y la cantidad de molde-iniciador unido a la RT se cuantificó usando el programa Tina versión 2.09. El porcentaje de complejo RT-DNA/DNA se representó frente a la concentración de enzima, y el valor de $K_{d[\text{DNA}]}$ se determinó como la concentración de RT a la cual el 50% del DNA se encuentra unido a la enzima.

3.7.3 Formación del complejo ternario estable y determinación de la afinidad de unión del dNTP ($K_{d[dNTP]}$ aparente).

La habilidad de los variantes de la RT del VIH-1 para formar complejos ternarios estables se ensayó como se ha descrito en trabajos anteriores (Tong *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2002). Se determinó la capacidad para formar complejos ternarios estables con las enzimas BH10, BH10_SSSY, SS, SS_2S0S, SS_Y215T, SS_Y215S y SS_Y215N

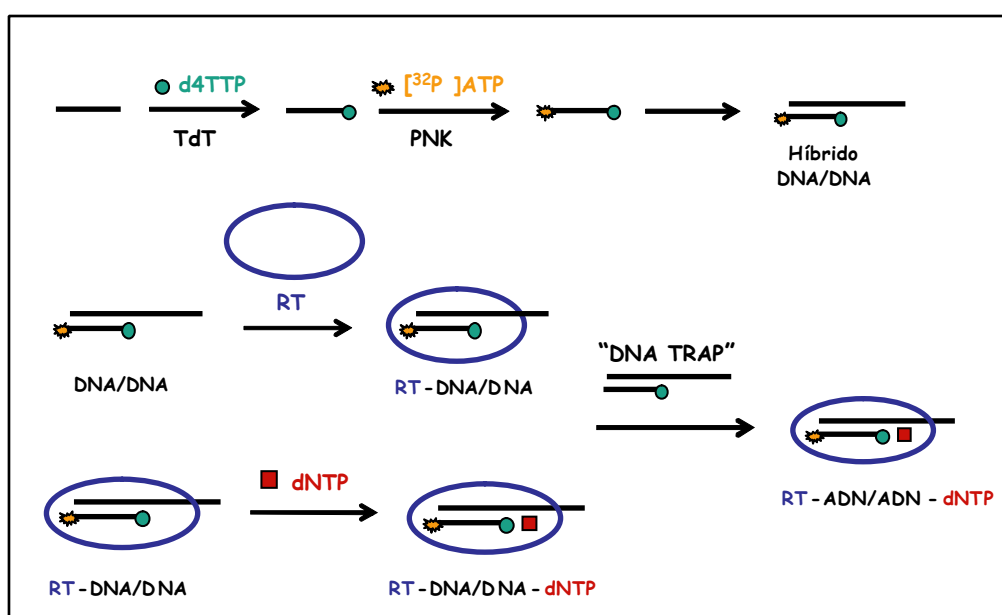


Figura 17. Esquema de los ensayos de retardo en gel. El iniciador es bloqueado con d4TTP y posteriormente marcado radiactivamente e hibridado al molde. Después de formarse el complejo binario (RT-DNA/DNA) se añade el dNTP para la formación de complejo ternario (RT-DNA/DNA-dNTP). Al añadir, a continuación el "DNA trap" solo se detectan los complejos ternarios estables.

Para este propósito, las RTs (20 nM) se incubaron con el molde-iniciador marcado D38/25PGA^{d4T} (0,3 nM) para formar el complejo binario en las condiciones que se han descrito anteriormente. Después, este complejo binario se incubó 15 min a 37°C en presencia de un exceso de dNTP (200 µM dATP, en nuestro caso) para obtener el complejo ternario estable. A los complejos ternarios formados se les añadió complejo molde-iniciador no marcado D38/25PGA^{d4T} ("DNA trap"), a una concentración final de 500 nM. Los complejos ternarios que permanecían estables en presencia de este "DNA trap" tras 10 min a 37°C (Figura 17), se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6% no desnaturalizantes que se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y se cuantificaron mediante el programa Tina versión 2.09.

La constante de afinidad de unión de dNTP aparente ($K_{d[dNTP]}$ aparente) de las RTs estudiadas se determinó, primero formando el complejo binario en las condiciones ya descritas y después estos complejos binarios se incubaron 15 min a 37°C en presencia de concentraciones crecientes del siguiente dNTP complementario (dATP, 0 a 4000 μ M) antes de añadir el “DNA trap” a 500 nM e incubar la muestra durante otros 10 min a 37°C.

En algunos experimentos, los complejos ternarios se obtuvieron en las mismas condiciones, en presencia de 200 μ M de foscarnet, que se añadió junto con el dNTP para determinar el efecto del análogo de PPi en la $K_{d[dNTP]}$ aparente.

Los complejos RT-DNA/DNA-dNTP resistentes al “DNA trap” se resolvieron y cuantificaron como se indicó anteriormente. Para determinar la $K_{d[dNTP]}$ aparente, el porcentaje total de complejo RT-DNA/DNA convertido en complejo ternario estable RT-DNA/DNA-dATP se representó en función de la concentración de dATP y estos valores se ajustaron a una ecuación exponencial.

3.8 Ensayos de extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP

Para la realización de estos ensayos se utilizaron los complejos M54/3TRP y D2-47/PG5-25 (Figura 15) a una concentración de 30 nM y las enzimas BH10, BH10_V75A, BH10_V75F, BH10_V75I, BH10_V75L, BH10_V75M, BH10_V75S y BH10_V75T a una concentración de 12 nM. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l de tampón HEPES 50 mM, pH 7,0 que contenía NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%. Después de preincubar la enzima y el complejo molde-iniciador durante 10 min a 37°C, se añadió una mezcla con los nucleótidos correspondientes y la reacción se mantuvo a 37°C durante 5, 15, 30 y 60 min. Tras las correspondientes incubaciones, la reacción se detuvo añadiendo solución de parada e incubando la mezcla posteriormente durante 10 min a 90°C.

Estos ensayos también se realizaron en presencia de Be^{2+} y Mn^{2+} . Para ello se utilizó el complejo M54/3TRP y las enzimas BH10 y BH10_V75I, en las mismas concentraciones indicadas en el párrafo anterior. Las reacciones se llevaron a cabo en 20 μ l del tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, conteniendo KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,05% y el cofactor correspondiente a una concentración final de 2 mM. Las

reacciones fueron iniciadas y posteriormente detenidas siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

Las mezclas de dNTPs utilizadas fueron: (*) dATP + dCTP + dGTP + dTTP, (-G) dATP + dCTP + dTTP, (-A) dCTP + dGTP + dTTP, (-T) dATP + dCTP + dGTP, para el complejo M54/3TRP y (*) dATP + dCTP + dTTP, (-A) dCTP + dTTP, (-T) dATP + dCTP para el complejo D2-47/PG5-25. La concentración final fue de 500 μ M para cada nucleótido. Los productos de las reacciones se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% que contenían urea 8 M. Los productos obtenidos se cuantificaron mediante un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm), tal como se ha descrito previamente (apartado 3.5).

3.9 Ensayos cinéticos para la determinación de la fidelidad de copia

3.9.1 Ensayos cinéticos en el estado estacionario

3.9.1.1 Incorporación de dNTPs correctos o incorrectos

Estos ensayos se basan en la determinación de los parámetros cinéticos para la incorporación de dNTPs correctos e incorrectos sobre un complejo molde-iniciador correctamente apareado. Se determinaron constantes cinéticas para las RTs BH10, BH10_V75A, BH10_V75F, BH10_V75I, BH10_V75L, BH10_V75M, BH10_V75S y BH10_V75T en ensayos de incorporación de nucleótidos correctos y para BH10, BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I en ensayos de incorporación de nucleótidos incorrectos. Se utilizó el complejo D2-47/PG5-25, siendo el nucleótido correcto dTTP y los incorrectos dCTP, dGTP y dATP. Los ensayos se llevaron a cabo en 10 μ l de un tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, que contenía acetato magnésico 15 mM, NaCl 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%. La concentración de enzima activa en el ensayo fue de alrededor de 6-10 nM, y la concentración del complejo molde-iniciador fue de 30 nM.

La reacción se inició mediante la incubación de la mezcla con la enzima y el complejo molde-iniciador durante 10 min a 37°C en ausencia de nucleótidos, seguida de la adición de los nucleótidos apropiados en concentraciones crecientes. Las mezclas se incubaron durante un tiempo de 10 a 40 s para los nucleótidos correctos y

de hasta 60 min para los nucleótidos incorrectos. Las reacciones se detuvieron añadiendo 4 μ l de solución de parada, incubándose luego las muestras durante 10 min a 90°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M.

Los geles se analizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5. Los porcentajes de iniciador elongado en un nucleótido obtenidos a las distintas concentraciones de dNTPs, se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, determinándose la constante catalítica, k_{cat} , y la constante de Michaelis aparente, K_m , para cada enzima y el correspondiente nucleótido. Así, se obtuvo una estimación de la fidelidad de copia de la RT, comparando la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) obtenida para los nucleótidos incorrectos respecto a la obtenida para el nucleótido correcto. La eficiencia de incorporación de nucleótidos erróneos (f_{inc}) se define como:

$$f_{inc} = [k_{cat}/K_m \text{ (nucleótido incorrecto)}] / [k_{cat}/K_m \text{ (nucleótido correcto)}]$$

3.9.1.2 Elongación de extremos desapareados

Este ensayo se basa en la determinación de los parámetros cinéticos para la incorporación del nucleótido correcto sobre un complejo molde-iniciador que presenta el extremo 3' del iniciador desapareado. Se analizaron las RTs BH10, BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I. Se compararon los parámetros cinéticos obtenidos para la incorporación de dTTP (nucleótido correcto) con los complejos, D2-47/PG5-25C, D2-47/PG5-25G y D2-47/PG5-25A ([Figura 15](#)) con los obtenidos para la incorporación de dTTP con el complejo correctamente apareado (D2-47/PG5-25) (apartado 3.9.1.1). El procedimiento para preparar complejos con extremos desapareados es el mismo que el seguido con complejos correctamente apareados (apartado 3.4).

El ensayo se realizó en las condiciones descritas en el apartado 3.9.1.1, utilizándose las mismas concentraciones de enzima activa y de complejos molde-iniciador. Después de añadir concentraciones crecientes de dTTP a una mezcla, preincubada a 37°C, de la enzima y el molde-iniciador, las reacciones se detuvieron pasados 20 s para las elongaciones del extremo A:C y después de 15-40 min para las extensiones de los extremos A:G y A:A. El procesamiento de las muestras y el análisis de los datos fueron idénticos a los establecidos en el apartado 3.9.1.1. En este caso se

pudo obtener una estimación de la capacidad de la enzima para extender extremos desapareados (f_{ext}), aplicando la fórmula:

$$f_{\text{ext}} = [k_{\text{cat}}/K_m \text{ (híbrido con extremo 3' desapareado)}] / [k_{\text{cat}}/K_m \text{ (híbrido con extremo 3' apareado)}]$$

3.9.2 Ensayos cinéticos en el estado pre-estacionario

3.9.2.1 Incorporación de dNTPs correctos

Con este método se determinaron los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario, para la incorporación de un nucleótido correcto en un complejo molde-iniciador correctamente apareado, para las enzimas BH10, BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I. Se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P siendo dTTP el nucleótido correcto incorporado. La obtención del complejo 31T/21P se ha descrito en el apartado 3.4. Los ensayos se realizaron utilizando un aparato de “Quench Flow” modelo QFM-400 (Bio-Logic Science Instruments).

Los ensayos se llevaron a cabo mezclando 12 μl del tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 50 mM y Triton X-100 al 0,05%), conteniendo enzima activa a una concentración de 50 nM y complejo molde-iniciador a 100 nM, con 12 μl del mismo tampón de reacción conteniendo concentraciones crecientes de dTTP en presencia de 12 mM de MgCl_2 .

Las reacciones se pararon con 12 μl de EDTA 0,9 M a diferentes tiempos en un intervalo comprendido entre 25 y 6000 ms, incubándose a continuación las muestras durante 10 min a 90°C. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20 % conteniendo urea 8 M. Los resultados se analizaron utilizando placas fotosensibles y un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm), tal como se ha detallado previamente (apartado 3.5).

La cantidad de iniciador elongado ($[P]$), obtenido a lo largo de los diferentes tiempos de reacción se ajustó a la ecuación:

$$[P] = A \times [1 - \exp(-k_{\text{obs}} \times t)] + k_{\text{ss}} \times t \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde A es la amplitud, k_{obs} es la constante aparente de formación del enlace fosfodiéster y k_{ss} es la tasa de recambio de la enzima, esto es, la constante cinética de la fase linear del estado estacionario.

La dependencia de la k_{obs} con la concentración de dNTP viene dada por la ecuación hiperbólica:

$$k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP]) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde k_{pol} y K_d son las constantes catalítica y de afinidad para la incorporación del dNTP respectivamente. Estas constantes se determinaron usando el programa Sigma Plot 2001 (Systat Software, Inc.).

3.9.2.2 Incorporación de dNTPs incorrectos

Estos ensayos se basan en la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario, para la incorporación de dNTPs incorrectos sobre un complejo molde-iniciador correctamente apareado. Se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P, siendo los nucleótidos incorrectos dCTP y dGTP. Se analizaron las RTs BH10, BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I. Los ensayos se llevaron a cabo manualmente en 40 μ l de tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 50 mM y Triton X-100 al 0,05%). La concentración de enzima activa en el ensayo fue de 120 nM, y la concentración del complejo 31T/21P fue de 100 nM.

A una mezcla preincubada durante 10 min a 37°C de la enzima y el complejo molde-iniciador se le añadió tampón de reacción conteniendo concentraciones crecientes del nucleótido apropiado y una concentración de $MgCl_2$ entre 12 y 24 mM. Tras incubar a 37°C durante 5-600 s, la reacción se detuvo añadiendo 4 μ l de solución de parada e incubando la muestra durante 10 min a 90°C. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. El análisis de los datos se llevó a cabo de la misma manera que en el apartado 3.9.2.1.

Los porcentajes de iniciador elongado ([P]) obtenidos a los diferentes tiempos de reacción se ajustaron a la ecuación:

$$[P] = A \times [1 - \exp(-k_{obs} \times t)] \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde A y k_{obs} serían la amplitud y la constante aparente de formación del enlace fosfodiésterse respectivamente. En las condiciones utilizadas en este ensayo, la concentración de enzima es mayor que la del complejo molde-iniciador, por lo que se elimina la influencia de la tasa de recambio de la enzima (k_{ss}), que podría interferir en las determinaciones de constantes cinéticas obtenidas a baja velocidad de incorporación.

La determinación de K_d y k_{pol} para cada enzima y el correspondiente nucleótido se llevó a cabo usando la ecuación 2 del apartado 3.9.2.1. De esta manera, se obtuvo una estimación de la fidelidad de copia de la RT comparando los parámetros cinéticos obtenidos con los nucleótidos incorrectos respecto a los obtenidos con el nucleótido correcto. La eficiencia de incorporación de nucleótidos erróneos se define como:

$$f_{\text{inc}} = [k_{\text{pol}}/K_d (\text{nucleótido incorrecto})] / [k_{\text{pol}}/K_d (\text{nucleótido correcto})]$$

3.9.2.3 Extensión de extremos desapareados

Con estos ensayos se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para la incorporación del nucleótido correcto sobre un complejo molde-iniciador con el extremo 3' del iniciador desapareado. Se analizaron las RTs BH10, BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I. Se compararon los parámetros cinéticos obtenidos para los complejos 31T/21PT, 31T/21PG y 31T/21PA (Figura 15), con los obtenidos con el complejo 31T/21P (apartado 3.9.2.1), para la incorporación de un nucleótido correcto (dTTP).

Estos ensayos se llevaron a cabo usando el aparato de “Quench Flow” modelo QFM-400 o bien manualmente cuando los tiempos de reacción fueron mayores de 8 s. La concentración de enzima activa en el ensayo fue de 120 nM, y la concentración del complejo molde-iniciador fue de 100 nM. Las reacciones se llevaron a cabo de la manera descrita en los apartados 3.9.2.1 y 3.9.2.2., según la metodología utilizada. El procesamiento de las muestras y el análisis de los datos fueron idénticos a lo establecido en el apartado 3.9.2.2. En este caso, se pudo obtener una estimación de la capacidad de la enzima para extender extremos desapareados (f_{ext}), aplicando la fórmula:

$$f_{\text{ext}} = [k_{\text{pol}}/K_d (\text{híbrido con extremo 3' desapareado})] / [k_{\text{pol}}/K_d (\text{híbrido con extremo 3' apareado})]$$

3.10 Ensayos genéticos para la determinación de la fidelidad de copia

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayo genético: ensayo de introducción de mutaciones y ensayo de reversión del fenotipo mutante. La única diferencia metodológica entre estos dos ensayos se encuentra en el molde-iniciador utilizado en la reacción de síntesis de DNA. Para el ensayo de introducción de mutaciones se usó como molde el DNA del fago M13mp2 (WT). En el caso del ensayo de reversión se utilizó como molde el plásmido M13mp2 que contenía un codón de terminación “amber” (TGA) en el gen *lacZ α* (M13mp2 mutante). Ambos moldes contienen un “gap” de 361 nucleótidos en una de sus hebras de DNA ([Figura 11](#)).

3.10.1 Construcción del molde de DNA

Una placa del bacteriofago M13mp2 (WT o mutante), se añadió a 1 litro de medio 2xYT (bactotriptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 5 g/l) que contenía 10 ml de un cultivo de células *E. coli* NR9099 [Δ (*pro-lac*), *thi*, *ara*, *recA56/F'* (*proAB*, *lacI_qZ Δ M15*)] crecido durante toda la noche. Se dejó que el fago infectase las células y el cultivo se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. Pasado este tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 30 min en un rotor GS3 (Sorvall). La forma replicativa (RFI) del fago M13mp2 se extrajo mediante el kit “QIAGEN Plasmid Maxi” (Qiagen). Con este método se obtiene DNA del fago en sus formas de cadena sencilla (ssDNA) y de doble cadena (dsDNA). La presencia de la forma ssDNA no interfiere en la digestión con la endonucleasa de restricción y se usó durante la hibridación para formar el “gapped” DNA.

Se cortaron 4 μ g del dsDNA, producto de la extracción, con 10 U de la enzima de restricción PvuII (Invitrogen) en 10 μ l del tampón recomendado por el fabricante. Después de 1 hora a 37°C, la digestión completa del DNA produjo cuatro fragmentos de 6789, 268, 93 y 46 pb. A continuación, se purificó el fragmento de DNA de 6789 pb por precipitación con polietilenglicol (PEG) tal como se describe en [Bebenek y Kunkel \(1995\)](#).

El dsDNA digerido y purificado se diluyó 10 veces (para disminuir la fuerza iónica) y se desnaturalizó mediante incubación a 70°C durante 5 min. Al final de esta incubación se añadió ssDNA en una proporción 1:1 respecto al dsDNA. La preparación del ssDNA se llevó a cabo por el procedimiento detallado en [Bebenek y Kunkel \(1995\)](#).

Después de mantener la mezcla en hielo durante 5 min se añadió tampón SSC (NaCl 300 mM, citrato sódico 30 mM) a una concentración final 2x y se incubó la muestra a 60°C durante 5 min. Para purificar el “gapped” DNA formado, se llevó a cabo una precipitación con etanol. La concentración se determinó en un gel de agarosa al 0,8% usando como patrón la forma RFI del fago M13mp2.

3.10.2. Reacción de síntesis de DNA *in vitro*.

Estas reacciones se llevaron a cabo con las RTs BH10, BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I. Para ello se mezclaron 50 ng de “gapped” DNA de M13mp2 (WT o mutante) con la enzima activa correspondiente a 100 nM y los cuatro dNTPs a 250 µM cada uno, en un volumen total de 10 µl de un tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,0 conteniendo KCl 100 mM, DTT 2 mM y MgCl₂ 4 mM. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 min y pasado este tiempo se detuvo la reacción añadiendo 1 µl de EDTA 60 mM.

Se comprobó que la síntesis del DNA había sido completa mediante un gel de agarosa al 0,8% y las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

3.10.3. Preparación de células electrocompetentes.

Se inocularon 4 ml de un cultivo reciente de las bacterias *E. coli* MC1061 [*hsdR*, *hsdM*⁺, *araD*, Δ (*ara*, *leu*), Δ (*lacI*POZY), *galU*, *galK*, *strA*] en 500 ml de medio 2xYT. Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0,5, las células se recogieron por centrifugación a 3600 rpm durante 10 min a 4°C, utilizando un rotor SS-34 (Sorvall). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 250 ml de agua fría estéril. De nuevo, se sometió la muestra a centrifugación en las mismas condiciones y se repitió este lavado dos veces más. El precipitado se resuspendió finalmente en glicerol al 75%. Se hicieron alícuotas de 50 µl y se guardaron a -70°C.

3.10.4. Electroporación y plaqueo

Se añadió 1 µl de DNA (producto de la reacción de síntesis) a una alícuota de 50 µl de las células electrocompetentes *E. coli* MC1061 y transcurridos 3 min en hielo la mezcla se transfirió a una cubeta de 0,2 cm y se electroporó en un equipo Bio-Rad “Gene Pulser” a 2,5 kV, 400 Ω y 25 µF. Inmediatamente después, se añadieron 0,5 ml de medio SOC (bactotripton 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl

2,5 mM, MgCl₂ 20 mM, MgSO₄ 20 mM y glucosa 20 mM) y la muestra se incubó a 37°C durante 5 min. Las células electroporadas se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Para llevar a cabo el plaqueo, se añadió una alícuota de la mezcla de electroporación, de 3 a 12 µl para el ensayo de introducción de mutaciones y de 40 a 100 µl para el ensayo de reversión, a 2,5 ml de “top agar” (NaCl al 0,9% y bactoagar al 0,8%) precalentado a 50°C. Posteriormente, se añadieron 500 µg de IPTG, 2,5 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactopiranosido (X-Gal) y 0,5 ml de un cultivo en fase logarítmica de células *E. coli* CSH50 [Δ (*pro-lac*), *thi*, *ara*, *strA/F'* (*proAB*, *lacI_q*ΔM15, *traD36*)] (cepa de α-complementación).

La mezcla anterior se añadió a placas Petri con medio M9 (Bebenek and Kunkel, 1995) y se dejó solidificar. Las placas Petri se incubaron durante 15 horas en una estufa a 37°C. Pasado este tiempo, se obtuvieron placas de distintos fenotipos, dependiendo del ensayo utilizado. En el ensayo de introducción de mutaciones se obtuvieron placas de fenotipo azul oscuro (WT) y placas de fenotipo azul claro y transparente (mutantes). En este caso se seleccionaron las placas transparentes y azul claro y se almacenaron en 500 µl de una solución de NaCl al 0,9%. En el ensayo de reversión se obtuvieron placas de fenotipo azul (mutantes) y placas de fenotipo transparente (WT). En el ensayo de reversión, las placas seleccionadas fueron las de fenotipo azul, que se almacenaron de la misma manera.

3.10.5. Análisis de mutantes

Se añadió una placa WT al tubo con NaCl al 0,9% en el que se encontraba la placa mutante. Después de 30 min se agitó el tubo energicamente y se diluyó 10⁶ veces. A continuación 5 µl de esta dilución se plaquearon en placas Petri con medio M9, como se ha descrito anteriormente (apartado 3.10.4). De esta manera se llevó a cabo una comparación directa del color de los distintos fenotipos.

Para purificar esta placa con fenotipo mutante se volvió a seleccionar y se creció durante toda la noche a 37°C en medio 2xYT. Una alícuota de este cultivo se diluyó 10⁸ veces y se plaqueó de nuevo en placas Petri con medio M9. Se obtuvo una placa aislada con el fenotipo mutante y se guardó en NaCl al 0,9%.

Para la comprobación por secuenciación del fenotipo mutante se inocularon 3 ml de medio 2xYT con 10 µl de la placa resuspendida en NaCl al 0,9%. Se extrajo el DNA mediante el kit “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega) y se secuenció el gen *lacZα*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2 y utilizando como iniciador el oligonucleótido 5'-CCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCG-3'.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Papel de la Tyr-215 y del Asp-67 en el mecanismo molecular de resistencia a NRTIs de RTs del VIH-1 portadoras de una inserción en el subdominio “fingers”.

Con el aumento de la complejidad de los tratamientos antirretrovirales han aparecido aislados multirresistentes portadores de nuevos patrones de mutaciones de resistencia. Aunque con una prevalencia relativamente baja (0,5 a 2,7%) se ha descrito la existencia de RTs que presentan inserciones en el subdominio “fingers”, concretamente en la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$. Esta inserción aparece normalmente acompañada de otros cambios de aminoácido relacionados con la resistencia a fármacos antirretrovirales, incluyendo mutaciones de resistencia a análogos de timidina (Tamalet *et al.*, 1998; Balotta *et al.*, 2000; Van Vaerenbergh *et al.*, 2000; Masquelier *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2004).

En trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, se demostró que una inserción de dos serinas entre los codones 69 y 70 era clave para la adquisición, por parte de la RT SS (Figura 13), de una actividad fosforolítica dependiente de ATP, que permite a esta enzima eliminar el AZT de iniciadores bloqueados por el fármaco en su extremo 3'. Sin embargo, la ausencia de la inserción no fue suficiente para eliminar la resistencia a AZT, debido posiblemente a la presencia de otras mutaciones de resistencia en el aislado viral que contiene la inserción (Mas *et al.*, 2000). Con la intención de analizar cuáles eran los determinantes moleculares de multirresistencia de esta RT, se decidió estudiar qué mutaciones aparecían asociadas a la inserción y cuáles eran las más importantes de cara a la adquisición del fenotipo de resistencia.

4.1.1 Mutaciones de resistencia en la RT del VIH-1 asociadas a inserciones en el subdominio “fingers”.

Se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva en la literatura de secuencias de RTs con una inserción de uno o dos aminoácidos en el subdominio “fingers”. En la Figura 18 se muestra el resumen de dicha búsqueda, en el que se indica la frecuencia con que aparecen las distintas inserciones y las mutaciones acompañantes.

Las inserciones más frecuentemente encontradas en aislados del VIH-1 fueron Ser-Gly, Ser-Ser y Ser-Ala y representaban aproximadamente las dos terceras partes del total de las secuencias portadoras de inserciones que han sido publicadas. Al analizar estas secuencias se observó que las mutaciones que aparecían asociadas más frecuentemente a estas inserciones eran M41L, K70R, L210W, y T215Y/F, todas ellas enmarcadas en el grupo de las TAMs. Se puede destacar que más del 95% de las secuencias analizadas mostraban un cambio que suponía la introducción de un residuo aromático (Tyr o Phe) en la posición 215. Sin embargo, la mutación D67N aparecía muy raramente en la secuencia consenso de estas RTs con inserciones en el subdominio “fingers”, a pesar de ser una mutación que se selecciona frecuentemente durante el tratamiento con análogos de timidina. Esta mutación se ha encontrado ocasionalmente en clones derivados de poblaciones virales (Lukashov *et al.*, 2001).

Inserciones	Número de secuencias	Sustituciones de aminoácido													Referencias
		M41L	A62V	D67E	D67G/S/Q/K	S68G/T/N/L/Y	K70R	K70A/Q/T/W	M184I/V	L210W	L210F	T215Y	T215F	T215I	
T69SSG	49	20/48	18/48	14/49	11/49	2/49	5/49	3/49	18/48	20/48	0/48	45/48	1/48	0/48	[1-5, 7, 8, 14, 17, 18, 23-26]
T69SSS	42	29/40	16/40	10/42	4/42	0/42	8/42	0/42	28/40	24/40	1/40	38/40	2/40	0/40	[1-3, 5, 7-9, 13, 14, 17, 18, 24, 27-29]
T69SSA	28	23/28	11/28	3/28	1/28	2/28	0/28	0/28	6/28	14/28	0/28	25/28	1/28	0/28	[2, 3, 7, 8, 14, 18, 23]
T69SST	17	17/17	7/17	8/17	0/17	0/17	0/17	0/17	9/17	12/17	0/17	17/17	0/17	0/17	[7, 8, 18]
T69SVG	8	1/8	0/8	1/8	2/8	0/8	0/8	1/8	2/8	2/8	0/8	1/8	0/8	2/8	[7, 8, 10, 17, 26]
T69SVT	8	8/8	5/8	5/8	0/8	1/8	0/8	0/8	2/8	7/8	0/8	8/8	0/8	0/8	[4, 7, 8]
T69ASG	6	6/6	3/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	6/6	0/6	6/6	0/6	0/6	[2, 8, 18]
T69AVG	4	4/4	0/4	0/4	1/4	4/4	0/4	0/4	1/4	4/4	0/4	4/4	0/4	0/4	[7, 18]
T69ASA	3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3	0/3	3/3	0/3	0/3	[14, 18]
T69AVA	3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	0/3	[18]
T69SES	3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	3/3	0/3	0/3	[7, 8, 30]
T69SQS	3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	[18]
T69STT	3	3/3	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	1/3	2/3	0/3	2/3	1/3	0/3	[7, 14]
T69SCA	2	2/2	0/2	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	[7, 18]
T69SCT	2	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2	2/2	0/2	0/2	[7]
T69SMT	2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	[3, 7]
T69STG	2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	[8, 26]
T69SVA	2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	[7, 30]
T69SVS	2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	[7, 30]
T69ASS	1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	[18]
T69SIG	1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	[7]
T69SSC	1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	[7]
T69SSK	1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	[7]
T69STS	1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	[2]
T69TTR	1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	[3]
T69SD	7	0/7	1/7	0/7	7/7	6/7	6/7	0/7	2/7	0/7	0/7	0/7	5/7	0/7	[8, 18]
T69TT	6	0/6	0/6	0/6	4/6	0/6	6/6	0/6	4/6	0/6	0/6	4/6	0/6	0/6	[7, 8, 19]
T69TD	2	2/2	0/2	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2	[5]
T69SG	1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	[8]
T69ST	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	[19]
Total	212	131/209	72/209	53/212	39/212	20/212	35/212	5/212	90/209	108/209	1/209	169/209	20/209	2/209	

Figura 18. Mutaciones de resistencia en el dominio polimerasa de la RT del VIH-1 asociadas con inserciones de uno o dos aminoácidos entre los codones 69 y 70. Se representa el número de secuencias en las que se encontró la mutación respecto al número total de secuencias que contienen información para ese residuo. Se muestran las sustituciones de aminoácidos de las posiciones con la mayor variabilidad.

^a Las referencias corresponden a los siguientes artículos: (1) De Antoni *et al.*, 1997; (2) Winter *et al.*, 1998; (3) Tamalet *et al.*, 1998; (4) De Jong *et al.*, 1999; (5) Rakik *et al.*, 1999; (6) Lukashov *et al.*, 2000; (7) Masquelier *et al.*, 2001; (8) Tamalet *et al.*, 2000; (9) Mas *et al.*, 2000; (10) Bonfanti *et al.*, 2000; (11) Sato *et al.*, 2001; (12) Van de Hoek *et al.*, 2005; (13) Van Vaerenbergh *et al.*, 2000; (14) Sugiura *et al.*, 1999; (15) Yahi *et al.*, 1999; (16) Briones *et al.*, 2001; (17) Balotta *et al.*, 2000; (18) Schneider *et al.*, 2004 (19) Tamalet *et al.*, 2004; (20) Lobato *et al.*, 2002; (21) Huigen *et al.*, 2004; (22) Winters *et al.*, 2005; (23) Ross *et al.*, 1999; (24) Briones *et al.*, 2000; (25) Lukashov *et al.*, 2001; (26) Bulgheroni *et al.*, 2004; (27) Yahi *et al.*, 2000; (28) Rousseau *et al.*, 2001; (29) Calvez *et al.*, 2002; (30) Andréoletti *et al.*, 2002.

En vista de los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias anteriores, se decidió estudiar el impacto de los cambios en las posiciones Tyr-215 y Asp-67, en el mecanismo de resistencia a AZT y d4T de la RT multirresistente SS. Esta enzima es un buen modelo para estudiar los efectos de cambios en estas posiciones, ya que además de la inserción de dos serinas entre los codones 69 y 70, presenta la mutación T215Y y al igual que la RT BH10 posee Asp en la posición 67 (Figura 13).

4.1.2 Escisión de AZT-monofosfato (AZTMP) y d4T-monofosfato (d4TMP) de iniciadores de DNA bloqueados

Para analizar el efecto de la Tyr-215 y el Asp-67 sobre la capacidad de la RT de escindir AZTMP y d4TMP de un iniciador bloqueado, se utilizaron los mutantes SS_Y215T, SS_Y215S, SS_Y215N y SS_D67N. La mutación Y215T implica dos cambios de nucleótido en el codón 215, mientras que las mutaciones Y215S y Y215N sólo implican uno y son, por tanto, potenciales intermediarios en una posible reversión de Tyr a Thr. Además, se utilizó la RT BH10_SSSY, que contiene tanto la inserción como la mutación T215Y en el contexto de secuencia de la enzima BH10, para determinar si ambos cambios eran suficientes para conferir resistencia a análogos de timidina. Otra enzima usada en este estudio fue SS_2S0S, a la que le falta la inserción pero que mantiene el contexto de secuencia de la RT SS (ver Figura 13 en Materiales y Métodos).

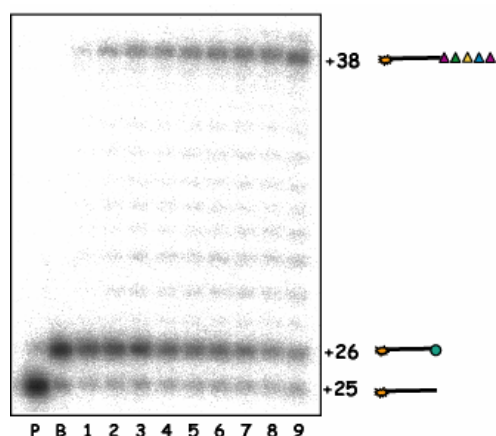
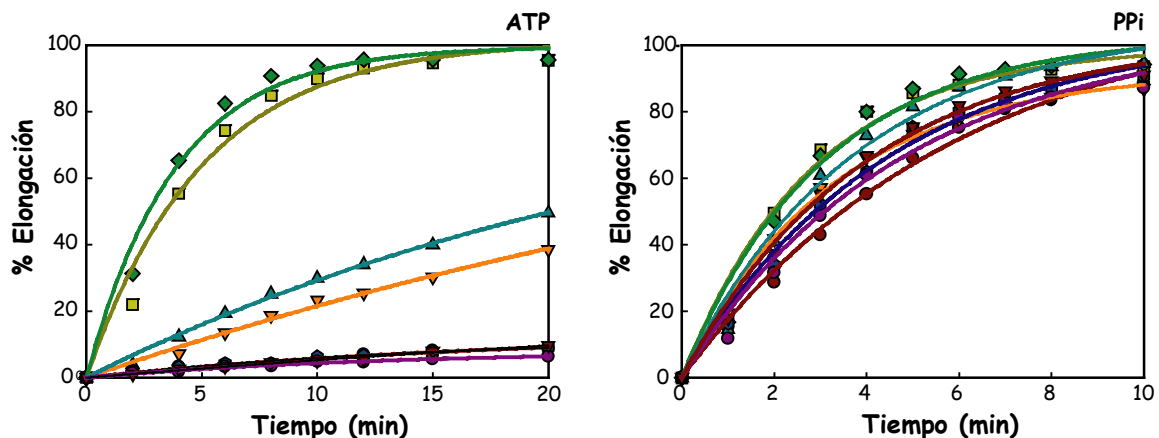


Figura 19. Reacción de escisión de iniciadores bloqueados con inhibidores análogos de timidina. Las reacciones de escisión se llevaron a cabo, primero, con la incorporación del inhibidor trifosfato (●) (AZTTP, en este caso) en un iniciador de 25 nucleótidos marcado con [γ - 32 P]ATP (★) (pocillo P), generándose un iniciador bloqueado de 26 nucleótidos (pocillo B). La escisión del inhibidor por la adición de ATP o PPi y una mezcla de todos los dNTPs (▲), dio lugar al producto totalmente elongado de 38 nucleótidos. El siguiente dNTP complementario es añadido a baja concentración, debido a su capacidad para inhibir la reacción. Los pocillos del 1 al 9 corresponden a las alícuotas recogidas a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 y 30 min después de la adición del ATP o PPi.

La capacidad de estas RTs para rescatar iniciadores terminados con AZTMP o d4TMP se analizó usando el complejo molde-iniciador D38/25PGA (Figura 14). Estos experimentos se llevaron a cabo en dos etapas. Primero, se incubó la RT con el molde-

iniciador en presencia del inhibidor en su forma trifosfato, produciéndose la incorporación de éste y el bloqueo del iniciador. Después, por la adición de dNTPs en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP o PPi, se produjo la reacción de desbloqueo y la extensión del iniciador (Figura 19). Los resultados de estas cinéticas de rescate se muestran en la Figura 20.

A) AZTTP



B) d4TTP

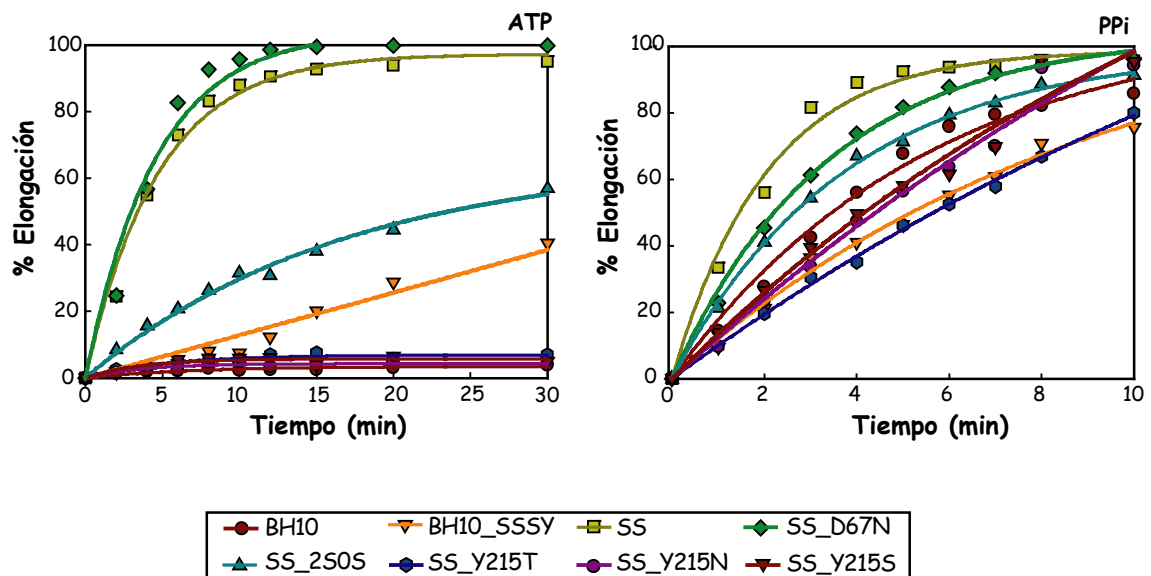


Figura 20. Efecto de distintas mutaciones en las reacciones de rescate de iniciadores bloqueados con AZTTP (A) o con d4TTP (B). Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (paneles de la izquierda) o de PPi 200 μM (paneles de la derecha). Todos los dNTPs en estos ensayos se usaron a una concentración de 100 μM, excepto el dATP cuya concentración fue de 1 μM. Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de enzima activa en los ensayos fue de 10 nM. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

Cuando los iniciadores se bloquearon con AZTTP, la RT SS y el mutante SS_D67N mostraron elevada eficiencia de escisión en presencia de ATP. Sin embargo, los mutantes de la RT SS a los que les faltaba el anillo aromático en la posición 215 (SS_Y215T, SS_Y215N y SS_Y215S), no presentaron ninguna actividad fosforolítica dependiente de ATP (Figura 20A). La sustitución de la Tyr-215 tuvo un efecto mayor que la eliminación de las dos serinas que forman la inserción (mutante SS_2S0S). Sin embargo, la presencia de la inserción junto con un residuo aromático en la posición 215 (mutante BH10_SSSY) no fue suficiente para restablecer la actividad fosforolítica dependiente de ATP a los niveles de la RT SS. En las reacciones de fosforólisis llevadas a cabo en presencia de PPi y usando iniciadores bloqueados con AZTMP no se detectaron diferencias significativas entre los distintos mutantes (Figura 20A).

Las cinéticas del rescate de d4TMP en presencia de ATP fueron muy similares a las obtenidas con iniciadores bloqueados con AZTMP para todas las RTs analizadas (Figura 20B). El cambio D67N presentó un efecto mínimo en la reacción de rescate, mientras que la eliminación del anillo aromático de la posición 215 condujo a la pérdida casi total de la actividad fosforolítica dependiente de ATP. El mutante 2S0S dio lugar a la pérdida del 50% de esta actividad. Al igual que para el AZT, la inserción junto con el cambio T215Y no fue suficiente para conferir los niveles de actividad fosforolítica dependiente de ATP que poseía la enzima SS. Es interesante destacar que, al contrario que con iniciadores bloqueados con AZTMP, sí se detectaron algunas diferencias entre los distintos mutantes en el rescate de iniciadores bloqueados con d4TMP, en presencia de PPi. La velocidad de escisión obtenida con la RT SS fue tres veces superior a la obtenida con los mutantes SS_Y215T, SS_Y215S y SS_Y215N (Figura 20B).

4.1.3 Inhibición de la reacción de escisión por el siguiente nucleótido complementario.

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la reacción de escisión puede ser inhibida por el siguiente dNTP complementario, debido a la formación de un complejo estable ("dead end complex") (Mas *et al.*, 2000, 2002).

Como se puede observar en la Tabla 4 las reacciones de rescate de AZTMP catalizadas por las RTs BH10_SSSY, SS, SS_2S0S y SS_D67N fueron muy resistentes a la inhibición por dNTP ($CI_{50} > 0,4$ mM). Sin embargo, la escisión de d4TMP catalizada por estas enzimas fue alrededor de 20 veces más sensible a esta inhibición (Tabla 4).

Tabla 4. Inhibición de la reacción de rescate dependiente de ATP o PPi por el siguiente dNTP complementario

Enzimas	CI ₅₀ (μM) para el siguiente nucleótido complementario ^a			
	Escisión dependiente de ATP		Escisión dependiente de PPi	
	Iniciador bloqueado con AZTMP	Iniciador bloqueado con d4TMP	Iniciador bloqueado con AZTMP	Iniciador bloqueado con d4TMP
BH10	ND	ND	>400	18,0 ± 1,9
BH10_SSSY	>400	ND	>400	7,6 ± 1,1
SS	>400	10,1 ± 1,8	>400	14,7 ± 1,5
SS_2S0S	>400	11,0 ± 2,3	>400	18,8 ± 3,5
SS_D67N	>400	9,1 ± 1,8	>400	18,1 ± 2,1
SS_Y215T	ND	ND	>400	11,3 ± 0,9
SS_Y215S	ND	ND	>400	11,9 ± 1,5
SS_Y215N	ND	ND	>400	13,0 ± 1,3

^a La concentración de ATP y PPi usada en los ensayos fue de 3,2 mM y 200 μM respectivamente. Todos los dNTPs se utilizaron a una concentración de 100 μM, a excepción del dATP cuya concentración varió entre 1 y 800 μM. Se utilizó una concentración de enzima activa entre 10 y 20 nM y una concentración de híbrido de 30 nM. Las muestras se incubaron de 0 a 15 min dependiendo del ensayo. En todos los casos los tiempos de incubación estuvieron dentro del rango lineal de las cinéticas correspondientes. El porcentaje de inhibición fue representado frente a la concentración de dATP y los datos se ajustaron a una hipérbola para obtener la CI₅₀ para cada enzima. Los datos que se muestran se obtuvieron de 3 experimentos y se expresan como media ± desviación estándar.

ND, no determinado debido a la baja eficiencia de la reacción de escisión.

En nuestras condiciones experimentales, ni el donador de pirofosfato (ATP o PPi), ni la mutación introducida en la RT, tuvieron una influencia significativa en los valores de CI₅₀ para el siguiente dNTP complementario. Esta observación entra en contradicción con otros trabajos donde se muestran diferencias en la sensibilidad a la concentración del siguiente dNTP complementario entre RTs que presentan niveles distintos de fosforólisis dependiente de ATP. Así, se ha observado que en presencia de ATP, las RTs que contienen una inserción de dos aminoácidos entre los codones 69 y 70, acompañada por la mutación T215Y eran más resistentes a la inhibición por el siguiente nucleótido complementario en reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con ddAMP (Meyer *et al.*, 2003a).

Por otra parte, también se ha publicado que la concentración del siguiente dNTP complementario, necesaria para que la RT pase de un estado pretranslocacional a un estado postranslocacional, y por tanto para que se produzca la inhibición de la reacción de escisión, es bastante mayor para el mutante M41L/T69SSS/T215Y que para la RT BH10 (Marchand *et al.*, 2003). Para intentar aclarar por qué nuestros ensayos no detectaron diferencias en la sensibilidad de las RTs mutantes a la inhibición por dNTP, se analizó el efecto de las mutaciones descritas anteriormente sobre la unión del dNTP a un complejo binario formado por la RT y el molde-iniciador. Para ello, se estudió la capacidad de las RTs mutantes para formar complejos ternarios estables.

4.1.4 Formación de complejos ternarios estables

La formación de complejos ternarios estables por parte de las distintas RTs se analizó mediante ensayos de retardo en gel. Estos experimentos se llevaron a cabo con las RTs: BH10, BH10_SSSY, SS, SS_2S0S, SS_Y215T, SS_Y215N y SS_Y215S, usando como complejo molde-iniciador D38/25PGA marcado con [γ^{32} P]ATP en su extremo 5' y bloqueado con d4TMP en el extremo 3' del iniciador (D38/25PGA^{d4T}).

En primer lugar se formó el complejo binario (RT-DNA/DNA), incubando concentraciones crecientes de la RT con una concentración de 0,3 nM del complejo D38/25PGA^{d4T}. Los resultados de estos ensayos mostraron que todas las RTs analizadas eran capaces de unir DNA bicatenario. Las constantes de disociación para el complejo RT-DNA/DNA fueron similares en todos los casos, variando entre 1,6 y 7,4 nM (Figura 21).

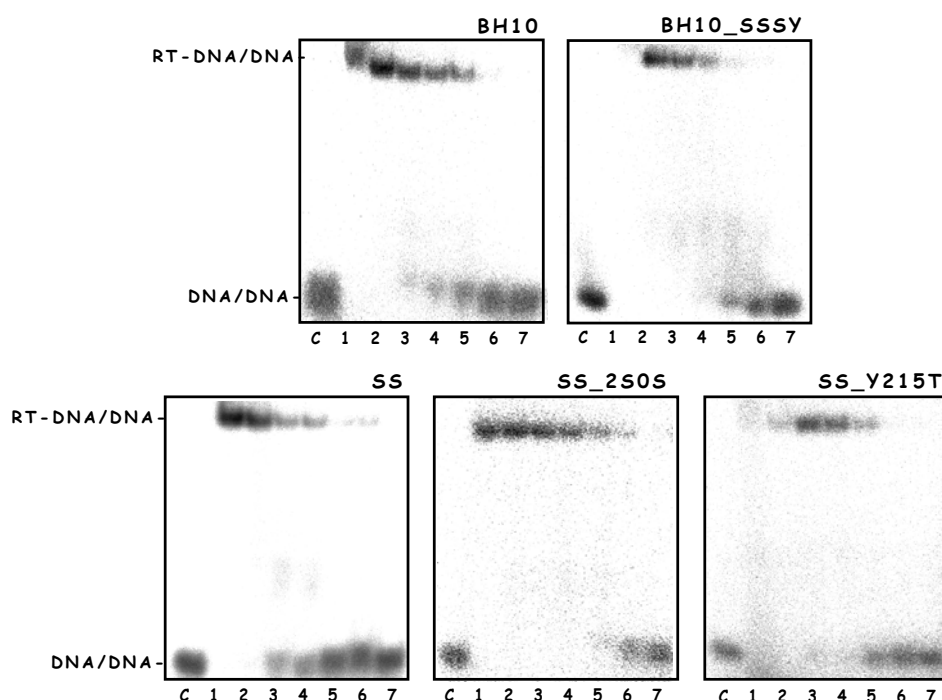


Figura 21. Análisis de la afinidad de unión del DNA mediante ensayos de retardo en gel. El molde de 38 nucleótidos se hibridó con un iniciador previamente bloqueado en su extremo 3' con d4TMP y marcado con [γ^{32} P]ATP en su extremo 5' (D38/PG25A^{d4T}). Una concentración de 0,3 nM de D38/PG25A^{d4T} marcado se incubó con diferentes concentraciones de enzima a 37°C durante 10 min. Los pocillos del 1 al 7 muestran la formación del complejo binario en presencia de concentraciones de RT de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 nM, respectivamente. C representa el control en ausencia de enzima. Las constantes de disociación obtenidas para los complejos RT-DNA/DNA fueron: $3,4 \pm 0,9$ nM para la RT BH10, $6,3 \pm 2,1$ nM para BH10_SSSY, $7,4 \pm 2,3$ nM para SS, $1,6 \pm 0,6$ nM para SS_2S0S y $2,7 \pm 1,3$ nM para SS_Y215Y.

A continuación, se analizó la estabilidad de los complejos ternarios (RT-DNA/DNA-dNTP) formados al añadir el siguiente dNTP complementario. Se sabe que la unión del

dNTP a la enzima es un mecanismo ordenado, ya que ocurre solamente cuando ha tenido lugar la unión del DNA. Por tanto, la formación de complejo ternario estable puede medirse como la cantidad de molde-iniciador que permanece unido a la enzima en presencia de altas concentraciones de dNTP y un exceso de “DNA trap”. Esto se ilustra en la [Figura 22A](#), en la que se muestra la elevada estabilidad del complejo ternario frente al complejo binario usando como modelo la enzima BH10. En presencia de un exceso molar de “DNA trap” de más de 1500 veces, el complejo RT-DNA/DNA desapareció, mientras que una cantidad significativa de complejo ternario resistió a la competición con el “DNA trap”. Los resultados que se muestran en la [Figura 22B](#) revelaron que los complejos RT-DNA/DNA formados por cada uno de los mutantes (pocillo 1) fueron totalmente eliminados con el “DNA trap” (pocillo 2), mientras que en presencia del siguiente nucleótido complementario (dATP en este caso) una parte del complejo ternario permaneció estable y fue resistente al “DNA trap” (pocillo 4). El porcentaje de complejo estable formado fue bastante similar en todas las RTs estudiadas, en torno a 40-50%.

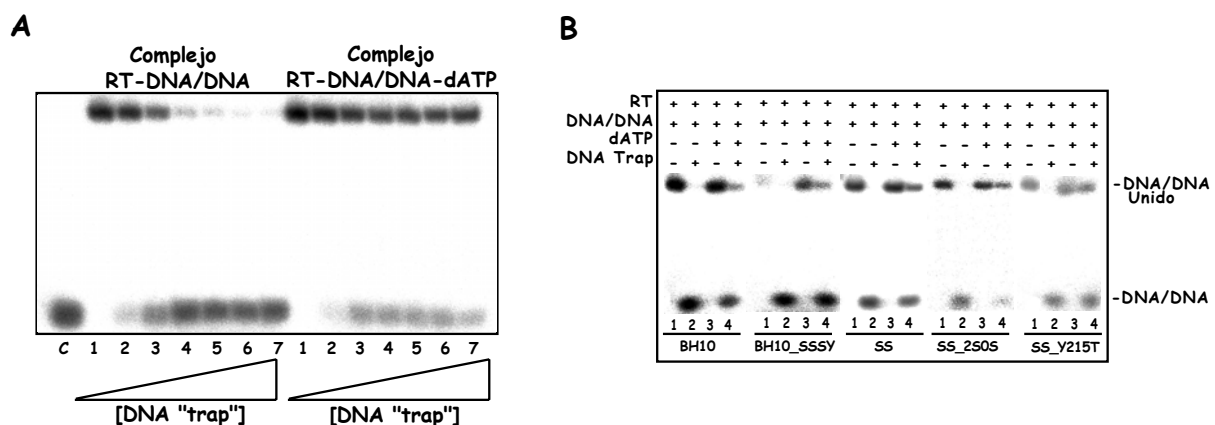


Figura 22. Efecto de la concentración de “DNA trap” en la formación de complejos ternarios estables. (A) Los complejos binario (panel de la izquierda) y ternario (panel de la derecha) de la RT BH10 se formaron incubando una concentración de RT de 20 nM con D38/25PGA^{d4T} 0,3 nM marcado radiativamente, a 37°C en ausencia o en presencia del siguiente dNTP complementario (dATP, 200 µM). Los pocillos 1–7 representan las concentraciones de “DNA trap” de 0, 50, 75, 100, 200, 300 y 500 nM, respectivamente. (B) Análisis de la formación del complejo ternario formado por las RTs derivadas de BH10 y SS. Al complejo binario (pocillo 1) y ternario (pocillo 3) para los distintos mutantes, formados como se ha descrito para el panel A, se les añadió “DNA trap” a 500 nM. Los pocillos 2 y 4 representan el grado de disociación del molde-iniciador en el complejo binario y ternario respectivamente.

La constante de afinidad de unión de dNTP aparente ($K_{d[dNTP]}$ aparente) para las RTs en estudio se calculó empleando una cantidad fija de complejo molde-iniciador (D38/25PGA^{d4T}) en función de la concentración de dATP (el siguiente dNTP complementario) ([Figura 23](#)). Los valores de $K_{d[dNTP]}$ aparente para las RTs SS, SS_2S0S y SS_Y215N fueron más de 5 veces superiores a las obtenidas con la RT BH10, y solamente algo mayores que las obtenidas con los mutantes BH10_SSSY, SS_Y215T y SS_Y215S ([Tabla 5](#)).

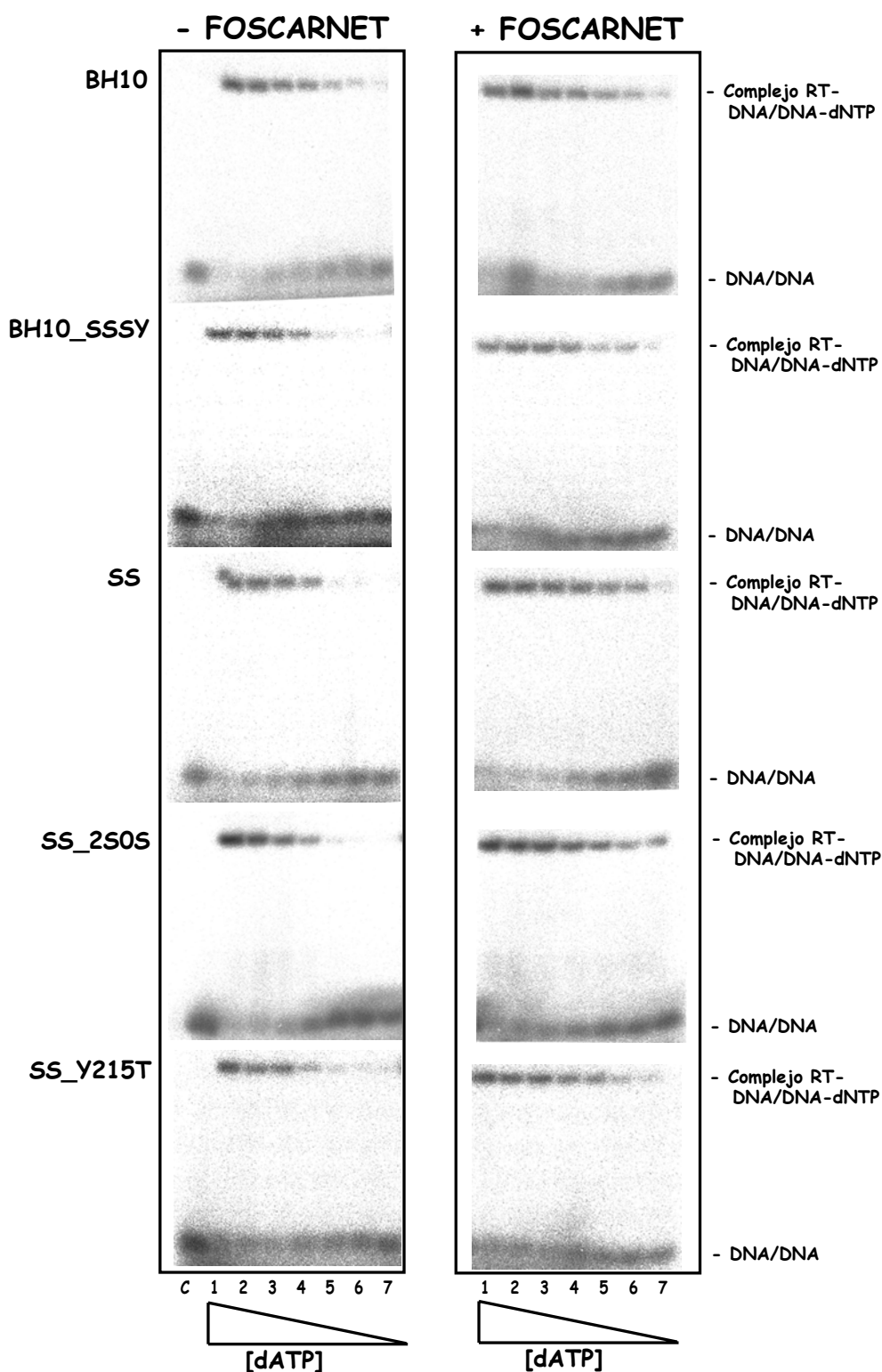


Figura 23. Determinación de la constante aparente de afinidad de unión del dNTP en complejos ternarios mediante ensayos de retardo en gel. La $K_{d[dNTP]}$ aparente de las RTs estudiadas fue determinada incubando complejos RT-DNA/DNA que contienen el iniciador marcado con $[\gamma^{32}P]ATP$ y bloqueado con d4TMP, en presencia de diferentes concentraciones de dNTP. La posición del molde-iniciador DNA/DNA libre y unido en el complejo ternario se muestran a la derecha. Los pocillos 1–7 indican los resultados obtenidos en presencia de las siguientes concentraciones de dATP: 4000; 800; 160; 32; 6,4; 1,28 y 0 μM , respectivamente. El pocillo C representa una reacción control llevada a cabo con enzima y sin dNTP. Los geles mostrados fueron obtenidos en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) de foscarnet 200 μM .

Para la mayoría de estas enzimas, los valores de $K_{d[dNTP]}$ aparente fueron significativamente más altos (Tabla 5) que los valores de CI_{50} obtenidos en los ensayos de rescate realizados en presencia de ATP o PPi (Tabla 4). Esta discrepancia, podría ser debida a la presencia del donador de PPi en la reacción. Obviamente, no es posible analizar la formación de complejos ternarios en presencia de ATP o PPi, ya que éstos son sustratos de la reacción de fosforolisis. Para superar esta limitación se determinaron los valores de K_d en presencia de foscarnet, un análogo de PPi.

El foscarnet es un inhibidor relativamente débil de la replicación de virus recombinantes que contienen las RTs BH10 y SS (Mas *et al.*, 2000). En ensayos de rescate llevados a cabo con iniciadores terminados con d4TMP, se obtuvieron valores de CI_{50} para el foscarnet de $99,8 \pm 7,2$ y $46,7 \pm 5,2$ μM con las RTs BH10 y SS, respectivamente. Aunque en principio se podría esperar que el foscarnet formase complejos ternarios estables con la RT y el DNA/DNA, al menos en nuestras condiciones de ensayo, los complejos ternarios RT-DNA/DNA-foscarnet fueron inestables, incluso a concentraciones de inhibidor por encima de 200 μM . Como se muestra en la Figura 23 y en la Tabla 5, cuando se llevó a cabo la formación de complejos ternarios RT-DNA/DNA-dNTP en presencia de foscarnet 200 μM , todas las RTs estudiadas mostraron $K_{d[dNTP]}$ aparentes similares.

Tabla 5. Valores de $K_{d[dNTP]}$ aparente obtenidos con las RTs estudiadas^a

Enzimas	$K_{d[dNTP]}$ aparente (μM)	
	sin foscarnet	con foscarnet
BH10	$18,8 \pm 8,5$	$10,8 \pm 8,0$
BH10_SSSY	$87,9 \pm 12,2$	$23,5 \pm 9,2$
SS	$106,3 \pm 25,8$	$13,4 \pm 5,6$
SS_2S0S	$129,3 \pm 31,8$	$10,7 \pm 2,5$
SS_Y215T	$58,4 \pm 7,7$	$22,4 \pm 12,2$
SS_Y215S	$81,4 \pm 13,9$	$26,9 \pm 7,5$
SS_Y215N	$109,4 \pm 32,8$	$39,7 \pm 10,5$

^aLos valores se representan como media \pm desviación estándar y fueron obtenidos de 3 a 5 experimentos independientes. El foscarnet se añadió a una concentración de 200 μM en estos ensayos.

4.2 Estudio de inhibidores potenciales de la reacción de escisión

La inhibición de la reacción de escisión podría ser una estrategia de gran utilidad en los tratamientos antirretrovirales, ya que son muchas las RTs que adquieren resistencia a través de este mecanismo de escisión. Un posible abordaje de este problema sería a través de la utilización de nuevos inhibidores que fueran capaces de bloquear el DNA pero que también fueran resistentes a la escisión. Por otro lado, el uso de compuestos capaces de competir con el ATP, pero sin la capacidad de funcionar como donadores de PPi, también podrían ser de utilidad para conseguir la inhibición de la reacción de escisión. En este estudio, se analizó el efecto sobre la reacción de escisión de varios derivados de los inhibidores de la RT, AZTTP y d4TTP, así como de distintos derivados de ADP y ATP, que actúan como donadores de PPi en esta reacción.

4.2.1 Efecto de análogos de timidina modificados en su fosfato α sobre el mecanismo de resistencia a NRTIs de una RT del VIH-1, resistente a múltiples inhibidores

4.2.1.1 Derivados α -borano de NRTIs

La introducción de un grupo BH_3 en el fosfato α de un NRTI produce un cambio en las propiedades físicas y químicas del inhibidor, pero no en su condición de sustrato de la RT del VIH-1. La introducción del grupo borano en el fosfato α de estos inhibidores genera un centro quiral dando lugar a dos posibles diastereoisómeros, R_p y S_p .

Estudios llevados a cabo previamente mostraron que derivados de AZTTP y otros inhibidores análogos a nucleósido portadores de un grupo BH_3 en el fosfato α eran capaces de inhibir de forma efectiva a RTs con mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales como K65R (Selmi *et al.*, 2001b), Q151M (Deval *et al.*, 2002) o la combinación formada por A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M (Deval *et al.*, 2002). Estas mutaciones o combinaciones de mutaciones producen una reducción de la constante de polimerización (k_{pol}) para la incorporación de ddATP y AZTTP. La presencia del grupo BH_3 en el fosfato α de los ddNTPs o del AZTTP suprime la resistencia *in vitro* a estos inhibidores. El grupo BH_3 aumenta la k_{pol} los ddNTPs sin afectar a su afinidad por el centro activo de la enzima (Selmi *et al.*, 2001b; Deval *et al.*, 2002, 2005).

En otros trabajos se ha descrito que los derivados α -borano son más estables frente a los mecanismos de rescate que contribuyen a la resistencia a fármacos antirretrovirales. Esta mayor estabilidad se observó en ensayos llevados a cabo con el mutante D67N/K70R/T215F/K219Q, en presencia de concentraciones altas de PPI y con el diastereoisómero R_p del α -BH₃-AZTTP (Meyer *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2001).

Con estos antecedentes, se consideró interesante extender estos estudios a otras RTs del VIH-1 multirresistentes, concretamente a la RT SS, que contiene una inserción Ser-Ser en el subdominio “fingers”, además de otras mutaciones de resistencia a NRTIs.

4.2.1.1.1 Reacción de escisión mediada por ATP de iniciadores bloqueados con derivados α -borano de AZTMP.

Ya que la resistencia a AZT por parte de la RT SS se debe a un aumento en su actividad fosforolítica dependiente de ATP, se quiso comprobar si esta enzima presentaba también este mecanismo de resistencia para los derivados α -borano de AZTTP. En primer lugar, se comparó la eficiencia de escisión del AZTMP con respecto a sus derivados α -(S_p)-BH₃-AZTMP y α -(R_p)-BH₃-AZTMP utilizando las RTs BH10 y SS y el complejo molde-iniciador D38/25PGA.

En las reacciones catalizadas por DNA polimerasas, la incorporación de los diastereoisómeros R_p o S_p del nucleósido 5'- α -tiotrifosfato se produce con una inversión en la configuración del fósforo (Verma y Eckstein, 1998). Sin embargo, no está claro si esta inversión de la configuración ocurre con los boranofosfatos. En esta Tesis se ha asumido que la incorporación de α -(R_p)-BH₃-AZTTP conlleva la formación de un iniciador terminado con α -(S_p)-BH₃-AZTMP, mientras que la incorporación de α -(S_p)-BH₃-AZTTP implica la formación de un iniciador terminado con α -(R_p)-BH₃-AZTMP.

En la Figura 24 se puede observar que la RT multirresistente SS fue capaz de escindir y extender muy eficientemente iniciadores bloqueados con los dos derivados α -borano del AZTMP en presencia de ATP. La enzima BH10 mostró una actividad fosforolítica dependiente de ATP bastante significativa sobre iniciadores bloqueados con α -(S_p)-BH₃-AZTMP y en menor medida, sobre iniciadores bloqueados con α -(R_p)-BH₃-AZTMP. Por el contrario, la RT BH10 fue incapaz de escindir eficazmente el inhibidor de iniciadores bloqueados con AZTMP.

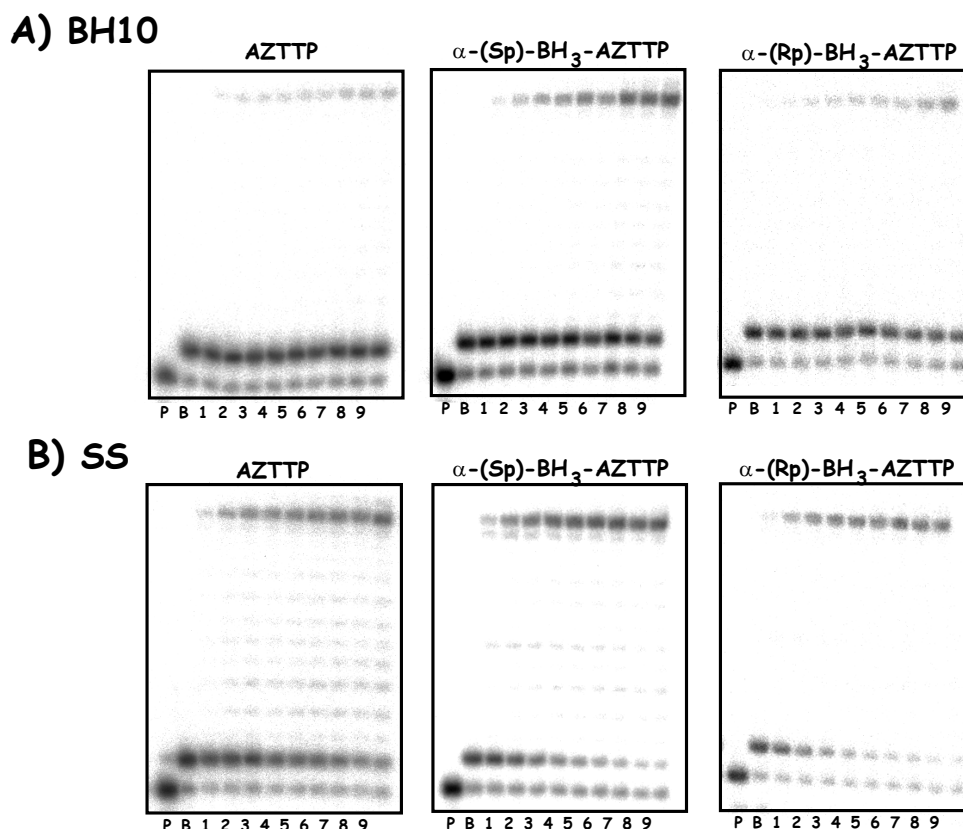


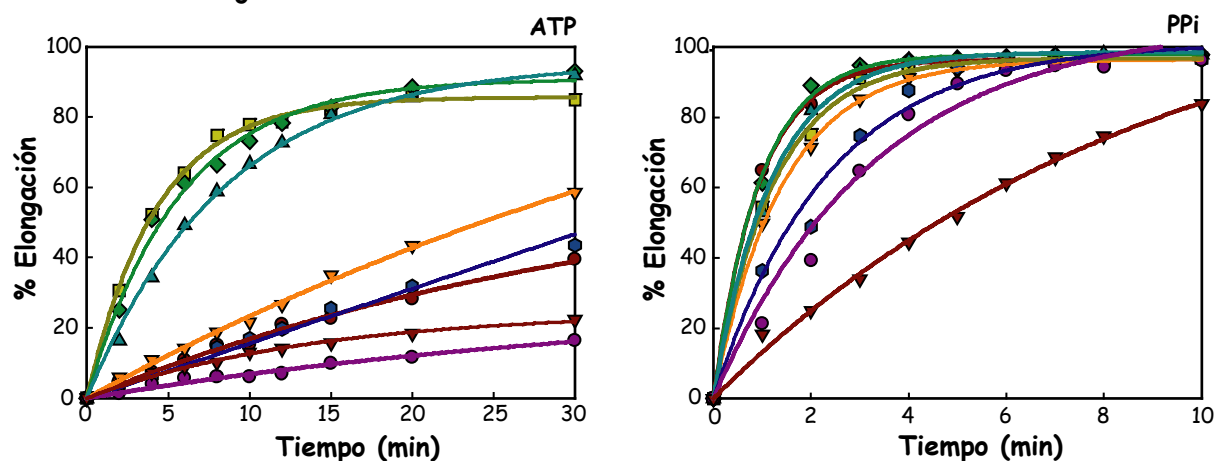
Figura 24. Reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTTP, α -(S_p)- BH_3 -AZTTP y α -(R_p)- BH_3 -AZTTP en presencia de ATP, usando las RTs BH10 (A) y SS (B). Se usó como molde-iniciador D38/25PGA. Los pocillos P y B representan el iniciador de 25 nucleótidos antes y después de la incorporación del inhibidor, respectivamente. Los pocillos 1 a 9 muestran los productos obtenidos al extraer alícuotas de la reacción de escisión a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 y 30 min, después de la adición de ATP a una concentración 3,2 mM.

Para profundizar en el estudio de los derivados α -borano del AZTTP, se analizó el papel que pudiera desempeñar tanto la inserción como los residuos Tyr-215 y Asp-67 en el mecanismo de resistencia de la RT SS a estos inhibidores. Para ello, se llevaron a cabo cinéticas de rescate con las mismas enzimas que en el apartado 4.1.2. Los resultados obtenidos se muestran en la [Figura 25](#).

La actividad fosforolítica dependiente de ATP de la enzima SS y sus mutantes SS_D67N y SS_2S0S fue muy alta en reacciones con iniciadores bloqueados con ambos diastereoisómeros: α -(S_p)- BH_3 -AZTTP y α -(R_p)- BH_3 -AZTTP ([Figura 25](#)). Por otro lado, los mutantes que no presentan Tyr en la posición 215 (SS_Y215N, SS_Y215S y SS_Y215T) mostraron una capacidad de escisión baja, aunque significativa, similar a la observada con la enzima BH10. Sólo cuando el iniciador estaba bloqueado con α -(R_p)- BH_3 -AZTTP, la RT BH10_SSSY presentó un aumento significativo de la actividad fosforolítica dependiente de ATP con respecto a la enzima BH10 ([Figura 25](#)).

No se detectaron apenas diferencias entre mutantes en el rescate mediado por PPi, excepto en el caso de la RT SS_Y215S, que mostró menor actividad pirofosforolítica cuando se trataba de iniciadores bloqueados con α -(S_p)-BH₃-AZTMP.

A) α -(S_p)-BH₃-AZTTP



B) α -(R_p)-BH₃-AZTTP

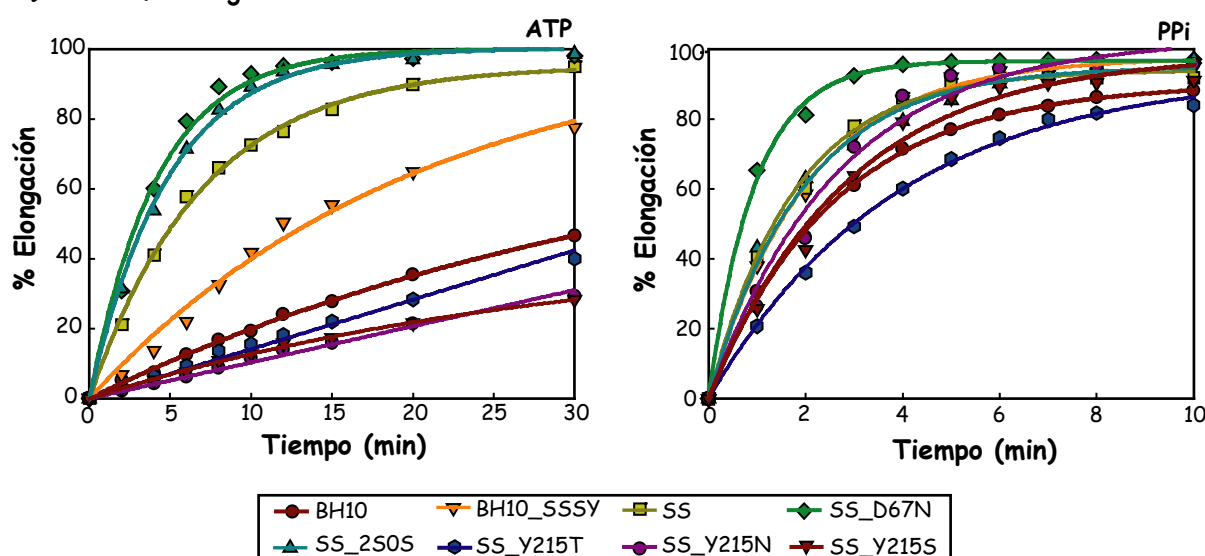


Figura 25. Efecto de distintas mutaciones en las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con derivados α -borano de AZTMP. Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo con iniciadores bloqueados con α -(S_p)-BH₃-AZTMP (A) y α -(R_p)-BH₃-AZTMP (B). Los paneles de la izquierda muestran las cinéticas realizadas en presencia de ATP 3,2 mM y los paneles de la derecha las realizadas en presencia de PPi 200 μ M. Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de todos los dNTPs en el ensayo fue de 100 μ M, excepto el dATP que se usó a 1 μ M. La concentración de enzima activa utilizada fue de 15-30 nM. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron menores del 20%.

4.2.1.1.2 Reacción de escisión mediada por ATP de iniciadores bloqueados con derivados α -borano de d4TMP

Con el fin de extender el estudio de resistencia a otros derivados de inhibidores análogos a timidina, se llevaron a cabo ensayos de rescate con iniciadores terminados con α -BH₃-d4TMP. Se usaron las RTs BH10, BH10_SSSY, SS, SS_2S0S, SS_D67N, SS_Y215T, SS_Y215N y SS_Y215S y el complejo D38/25PGA. Los resultados de estos ensayos se muestran en la [Figura 26](#).

A diferencia de lo que ocurría en la escisión de los derivados α -borano de AZTMP, cuando el iniciador se encuentra bloqueado con α -BH₃-d4TMP, la enzima BH10 no mostró ninguna actividad fosforolítica dependiente de ATP. Tanto la enzima SS como el mutante SS_D67N presentaron una elevada actividad fosforolítica dependiente de ATP. Sin embargo, la eficiencia del rescate para los mutantes SS_Y215N, SS_Y215S y SS_Y215T fue muy baja ([Figura 26](#)). Además, la eliminación de la inserción de la RT SS (SS_2S0S), produjo una reducción de la escisión mediada por ATP. Este efecto fue relativamente menor cuando se utilizaron iniciadores bloqueados con derivados α -borano de AZTMP, y similar al observado con iniciadores bloqueados con AZTMP ([Mas et al., 2000, 2002](#)).

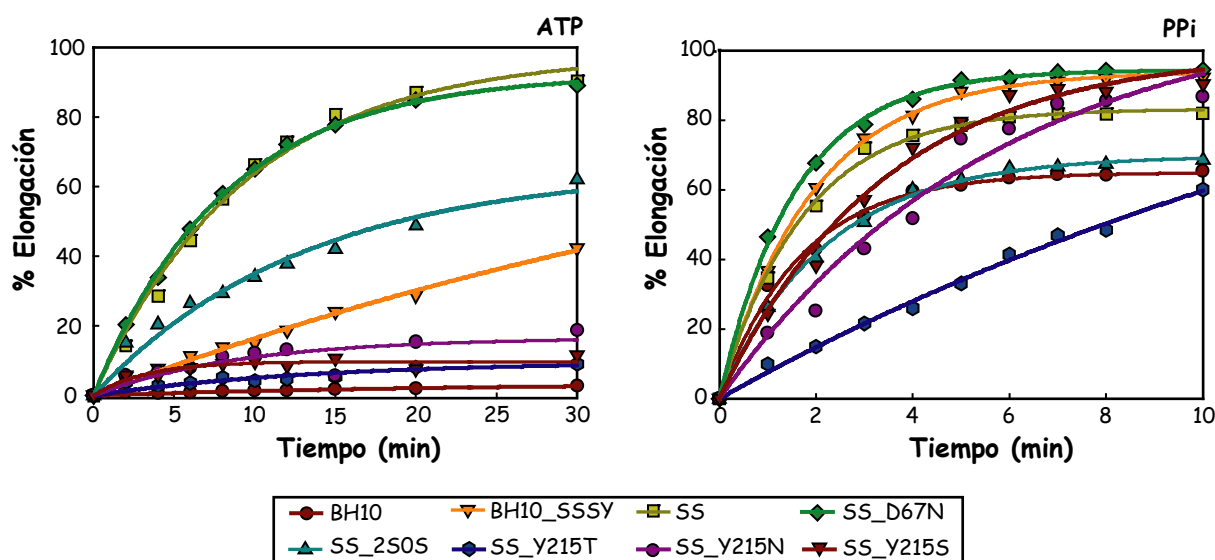


Figura 26. Efecto de distintas mutaciones en las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con α -BH₃-d4TMP. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (izquierda) y de PPi 200 μ M (derecha). Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de todos los dNTPs en el ensayo fue de 100 μ M, excepto el dATP que se usó a 1 μ M. La concentración de enzima activa utilizada fue de 24 nM. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron menores del 20%.

Los resultados obtenidos en las reacciones de pirofosforólisis mostraron diferencias muy sutiles entre todas las RTs analizadas, a excepción de los mutantes que no contienen Tyr en la posición 215 (SS_Y215N, SS_Y215S y SS_Y215T) que mostraron eficiencias de escisión de 2 a 10 veces menores que las obtenidas con la enzima SS (Figura 26).

Los ensayos que se muestran en la Figura 26 se llevaron a cabo con una mezcla de diastereoisómeros S_p y R_p del α -BH₃-d4TTP. Para comprobar que las diferencias observadas entre los derivados α -borano de AZTTP y d4TTP en estos ensayos no se debían a la quiralidad de estos inhibidores, se llevaron a cabo ensayos cinéticos utilizando las RTs SS, SS_2S0S y SS_SSSY y los diastereoisómeros α -(S_p)-BH₃-d4TTP y α -(R_p)-BH₃-d4TTP por separado. Los resultados de estas cinéticas no mostraron diferencias significativas que pudieran atribuirse a la estereoquímica del inhibidor (resultados no mostrados).

4.2.1.1.3 Inhibición de la escisión de derivados α -borano de AZTTP y d4TTP

La introducción del grupo BH₃ en el fosfato α del AZTTP y d4TTP no tuvo efectos significativos en los valores de CI₅₀ de las enzimas analizadas (Tabla 6). Las reacciones de escisión de iniciadores terminados con α -BH₃-d4TMP fueron inhibidas por concentraciones de dNTP comprendidas entre 9,4 y 28,9 μ M. Sin embargo, cuando el iniciador estaba bloqueado con derivados α -borano de AZTMP fueron necesarias concentraciones superiores a 0,4 mM para inhibir esta reacción.

Tabla 6. Capacidad del siguiente dNTP complementario para inhibir la reacción de rescate dependiente de ATP o PPi catalizado por las RTs BH10 y SS, sobre iniciadores bloqueados con derivados α -borano de AZTMP y d4TMP

Nucleótido análogo bloqueando el iniciador	CI ₅₀ (μ M) para el siguiente nucleótido complementario ^a			
	Escisión dependiente de ATP		Escisión dependiente de PPi	
	BH10	SS	BH10	SS
α -(S_p)-BH ₃ -AZTMP	116,6 \pm 32,3	308,2 \pm 114,7	>500 (37,2) ^b	439,5 \pm 34,4
α -(R_p)-BH ₃ -AZTMP	247,4 \pm 109,7	>500 (59,7)	>500 (47,6)	>500 (40,6)
α -(S_p)-BH ₃ -d4TMP	ND	9,4 \pm 1,3	29,8 \pm 8,6	19,5 \pm 6,0
α -(R_p)-BH ₃ -d4TMP	ND	11,2 \pm 1,5	26,7 \pm 4,1	22,9 \pm 2,5

^a La concentración de ATP y PPi usada en los ensayos fue de 3,2 mM y 200 μ M respectivamente. Todos los dNTPs se utilizaron a una concentración de 100 μ M, a excepción del dATP cuya concentración varió entre 1 y 800 μ M. Se utilizó una concentración de enzima activa entre 10 y 20 nM y una concentración de híbrido de 30 nM. Las muestras se incubaron de 0 a 15 min dependiendo del ensayo. En todos los casos los tiempos de incubación estuvieron dentro del rango lineal de las cinéticas correspondientes. El porcentaje de inhibición fue representado frente a la concentración de dATP y los datos se ajustaron a una hipérbola para obtener la CI₅₀ para cada enzima. Los datos mostrados fueron obtenidos de 3 a 7 experimentos y se expresan como media \pm desviación estándar.

^b Los números entre paréntesis indican el porcentaje de inhibición a 800 μ M dATP.

ND, no determinado debido a la baja eficiencia de la reacción de escisión.

Se observaron pequeñas diferencias entre las Cl_{50} s obtenidas en el rescate de iniciadores bloqueados con α -(S_p)- BH_3 -AZTMP y α -(R_p)- BH_3 -AZTMP. Mientras que para las reacciones de escisión del diastereoisómero S_p se obtuvieron valores de Cl_{50} muy similares a los obtenidos con AZTMP, las reacciones de rescate del diastereoisómero R_p fueron alrededor de dos veces más sensibles a la inhibición por dNTP.

4.2.1.2 Tioderivados de AZTTP

En estudios previos se demostró que los derivados α -tiofosfato de nucleótidos naturales (dATP, dCTP, dGTP, dTTP o dUTP) eran buenos sustratos para RNA y DNA polimerasas (Eckstein, 1985). La sustitución de uno de los oxígenos no enlazantes del fosfato α por un azufre introduce un centro quiral en este fosfato. Para la mayoría de las polimerasas sólo el diastereoisómero S_p es un buen sustrato y al incorporarlo en el DNA o RNA se produce una inversión de la configuración, dando lugar a la formación de un enlace fosfodiéster entre nucleótidos, en el que la quiralidad del fosfato es R_p (Verma y Eckstein, 1998).

En nuestro estudio se utilizó el compuesto 3'-azido-3'-desoxitimidin-5'-O-(1-tio)-trifosfato (AZTTP α S). En primer lugar, se comprobó si este compuesto era un buen sustrato de la RT del VIH-1. Este compuesto está disponible comercialmente (TriLink Biotechnologies) como una mezcla de los diastereoisómeros R_p y S_p , que contienen una proporción 2:1 del diastereoisómero S_p respecto al R_p . Estos diastereoisómeros se separaron mediante HPLC y se usaron como sustrato de la reacción de polimerización catalizada por la RT. Como se muestra en la Figura 27A, el derivado S_p es un buen sustrato de la reacción. A diferencia de otras polimerasas, como la polimerasa *Taq* (Figura 27B), la RT del VIH-1 es capaz de incorporar el derivado R_p aunque con menor eficiencia que el S_p (se observó una reducción en la velocidad de incorporación de 2,5 a 5 veces en comparación con el derivado S_p). Además, no se observaron diferencias en el comportamiento de la RT SS respecto a la RT BH10 en ninguno de los casos (Figura 27A).

Para comprobar si la RT multirresistente SS presentaba también resistencia a estos tioderivados de AZTTP, se llevó a cabo un análisis de la actividad fosforolítica de esta enzima, usando iniciadores bloqueados con los derivados R_p y S_p del AZTTP α S en presencia de ATP. Los resultados que se muestran en la Figura 27 revelaron que los iniciadores bloqueados con ambos diastereoisómeros son muy malos sustratos de la reacción de escisión dependiente de ATP. La enzima multirresistente SS no fue capaz de escindir estos derivados de AZT una vez incorporados.

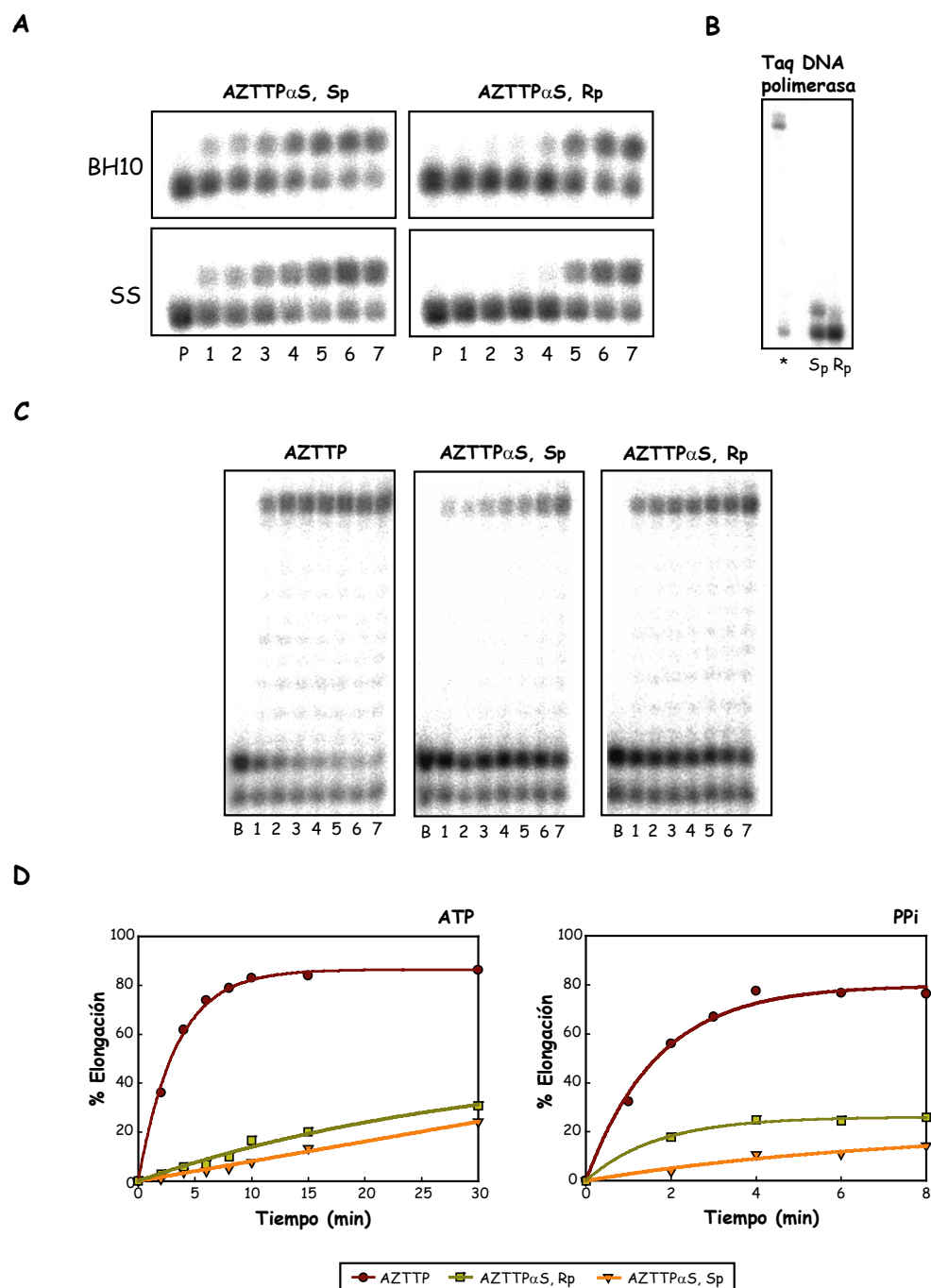


Figura 27. Reacciones de incorporación y rescate de tioderivados de AZT. (A) Cinéticas de incorporación de los diastereoisómeros R_p y S_p de AZTTP α S catalizadas por las enzimas BH10 y SS. El pocillo P representa el iniciador de 25 nucleótidos (25PGA) y los pocillos del 1 al 7 corresponden a alícuotas de la reacción de incorporación a 10, 20, 30 s; 1, 5, 15 y 30 min. En el panel (B) se muestra un control de incorporación con la polimerasa *Taq* (*Ampli-Taq*; Applied Biosystems). El asterisco (*) representa la extensión total cuando están presentes los cuatro dNTPs, y en los otros dos pocillos se muestra la incorporación de los dos diastereoisómeros de AZTTP α S. Estos productos se obtuvieron después de una incubación de 30 min con 5 U de la enzima, en Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM, conteniendo KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y, o bien 100 mM de cada uno de los 4 dNTPs, o 25 mM del correspondiente isómero de AZTTP α S. (C) Reacciones de rescate de iniciadores bloqueados con tioderivados de AZT catalizadas por la RT SS. Los pocillos P y B representan el iniciador antes y después de la incorporación del inhibidor. Los pocillos del 1 al 7 muestran los productos obtenidos después de 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 30 min de la adición de ATP 3,2 mM. (D) Representación gráfica de las reacciones de escisión llevadas a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (izquierda) y de PPi 200 μ M (derecha). Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de todos los dNTPs en el ensayo fue de 100 μ M, excepto el dATP que se usó a 1 μ M. La concentración de enzima activa utilizada fue de 24 nM. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron menores del 20%.

La reacción de pirofosforólisis también fue muy lenta en comparación con las cinéticas llevadas a cabo con iniciadores terminados con AZTMP (Figura 27D). La reducción de la actividad pirofosforolítica también se observó con la enzima BH10, que mostró cinéticas similares a las observadas con la RT SS, en concordancia con los datos publicados en Schneider et al., (2001). En todos los casos, la resistencia a la fosforólisis dependiente de ATP y PPi fue mayor con el diastereoisómero S_p .

4.2.2 Efecto de distintos donadores de PPi sobre el mecanismo de escisión de NRTIs

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron derivados de ADP y ATP que presentan modificaciones en sus fosfatos β o γ , o bien en sus enlaces fosfodiéster α,β o β,γ (Figura 28A). Se determinó la habilidad de la RT SS para rescatar AZTMP de iniciadores bloqueados en presencia de estos derivados de ATP y ADP, utilizando D38/25PGA como complejo molde-iniciador. Estos análogos a ATP y ADP se encuentran disponibles comercialmente y se usaron a una concentración final de 1 mM.

La actividad fosforolítica observada con los derivados de ADP fue similar a la obtenida con ADP. Ni la sustitución del fósforo β por un azufre, en adenosina-5'-O-fosfosulfato (APS), ni esta modificación unida a la sustitución del oxígeno del enlace α,β por un grupo metileno (β -metilen-APS) tuvieron ningún efecto en la velocidad de escisión del AZTMP (Figura 28B, gráfica de la izquierda).

La introducción de un grupo imido, en vez del enlace β,γ -fosfodiéster del ATP produjo un ligero incremento en la velocidad de rescate. Sin embargo, la sustitución de uno de los oxígenos del fosfato γ del ATP por un azufre produjo una reducción de 2 veces de la actividad fosforolítica dependiente de la RT SS (Figura 28B, gráfica de la izquierda).

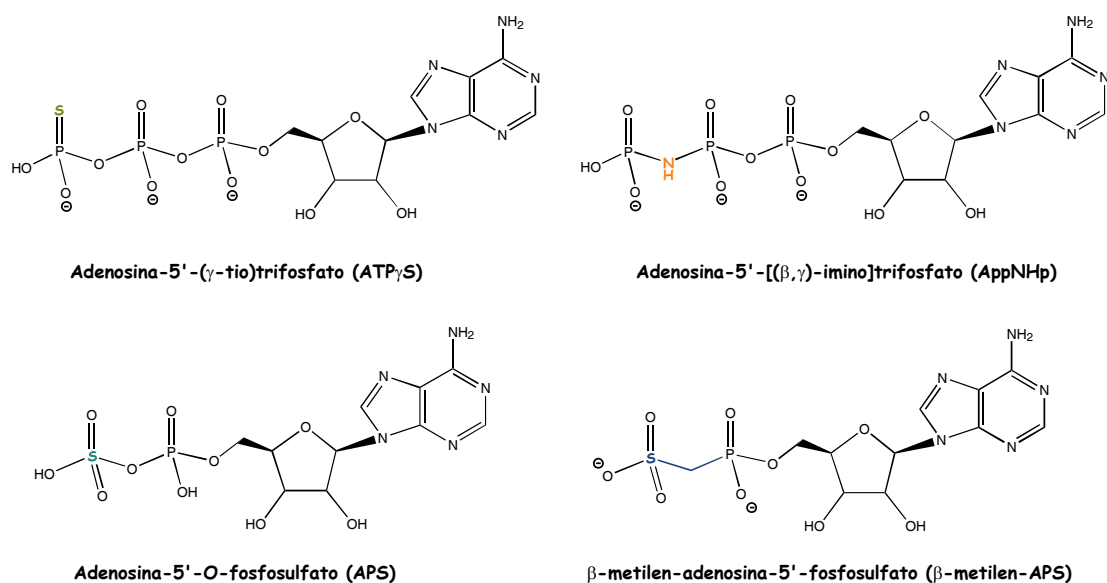
Para analizar si esta reducción de la actividad fosforolítica era extensible a otros inhibidores de la RT, se realizaron los mismos experimentos utilizando los derivados α -borano del AZTTP. Los resultados mostraron una reducción de la actividad fosforolítica de la RT SS para los iniciadores bloqueados con ambos diastereoisómeros de AZTMP, aunque el efecto fue algo mayor con el diastereoisómero S_p (Figura 28B, gráfica de la derecha).

Aunque el azufre en el fosfato γ no introduce ninguna quiralidad al ATP γ S, es importante tener en cuenta que las reacciones de escisión en presencia de este derivado del

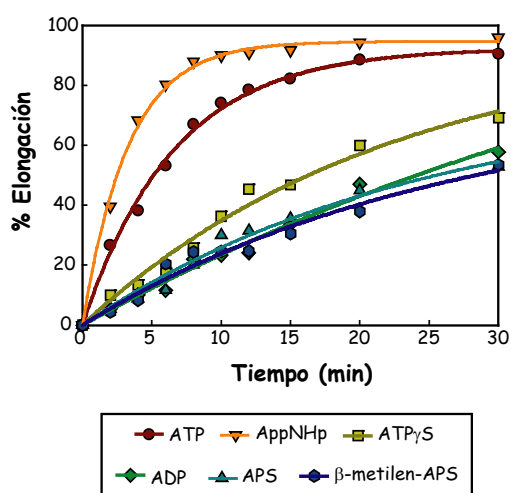
ATP pueden conducir a la formación de dos isómeros del correspondiente dinucleótido tetrafosfato.

A pesar de que ninguno de estos compuestos fue capaz de inhibir la reacción de fosforólisis, estos resultados demuestran que los oxígenos del fosfato γ del ATP juegan un papel importante en esta reacción (Figura 28B).

A



B



C

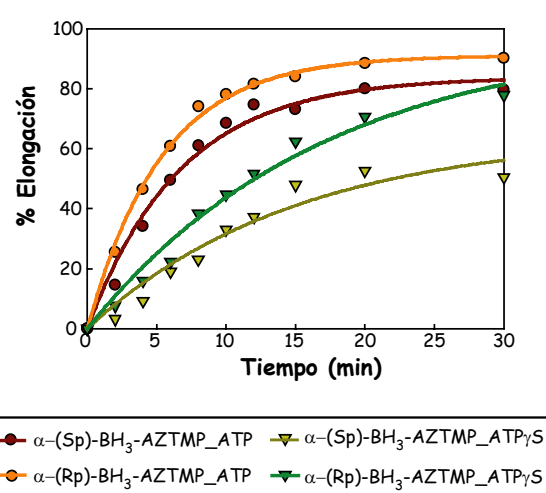


Figura 28. Reacciones de rescate en presencia de derivados de ADP y ATP. (A) Estructuras químicas de los derivados de ADP y ATP usados en los ensayos de rescate. **(B)** Cinéticas de rescate de iniciadores bloqueados con AZTMP catalizadas por la RT SS, obtenidas en presencia de ATP, AppNHp, ATP γ S, ADP, APS o β -metilen-APS a una concentración de 1 mM. **(C)** Comparación de las cinéticas de rescate catalizadas por la RT SS en presencia de ATP o ATP γ S (1 mM) de iniciadores bloqueados con α -(Sp)-BH $_3$ -AZTTP o α -(Rp)-BH $_3$ -AZTTP. En todos los ensayos, las concentraciones de la RT y del complejo molde-iniciador fueron de 24 nM y 30 nM, respectivamente.

4.3 Análisis del efecto de mutaciones en la posición 75 sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1

La horquilla $\beta 3\text{-}\beta 4$ (residuos 56-77) además de jugar un papel importante en la resistencia a NRTIs (Gu *et al.*, 1994; Tantillo *et al.*, 1994; Deval *et al.*, 2004a; Miller *et al.*, 2004), modula otros muchos aspectos de la actividad de la RT del VIH-1, incluyendo fidelidad (Kim *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2000), procesividad (Arion *et al.*, 1996; Kew *et al.*, 1998), pirofosforólisis (Sluis-Cremer *et al.*, 2000) y desplazamiento de cadena (Fisher *et al.*, 2003)

Se llevó a cabo un análisis de los aminoácidos que interaccionan con el extremo 5' desapareado del molde tomando como referencia la estructura cristalográfica del complejo ternario, formado por la RT unida a un complejo molde-iniciador (DNA/DNA) y a dTTP (Huang *et al.*, 1998). De esta forma, se observó que los residuos 24-27, 30 y 61-63 interaccionan con las posiciones +2 y +3 del molde, siendo Trp-24, Pro-25, Lys-30, Phe-61 e Ile-63 los que presentan mayor superficie de contacto con la hebra molde. Por otra parte, los residuos 72, 74-78 y 81 interaccionan con el nucleótido +1 del molde. De entre todos ellos, la Leu-74 y la Arg-78 son los que exhiben un mayor número de interacciones (Figura 29). De los aminoácidos que se muestran en la Figura 29, Asp-76, Arg-78 y Asn-81 están absolutamente conservados en todas las RTs de retrovirus. Además, Trp-24, Pro-25, Leu-74 y Val-75 son residuos conservados en aislados naturales del VIH, aunque se ha observado la aparición de mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales que afectan a las posiciones 74 (L74V, L74I) y 75 (V75I, V75T, V75L, V75S, V75M, V75A) (revisado en Menéndez-Arias, 2002b).

Estudios llevados a cabo con anterioridad permitieron identificar aquellos aminoácidos que interaccionan con el extremo 5' desapareado del molde y pueden influir en la fidelidad de copia de la RT del VIH-1. Aunque el efecto de distintas mutaciones sólo se ha estudiado sistemáticamente para el Asp-76 (Kim *et al.*, 1998), también se han publicado datos obtenidos con RTs portadoras de cambios en las posiciones 74, 76 y 78. En estos estudios se han encontrado varios ejemplos de RTs mutantes que presentan mayor fidelidad de copia en comparación con la enzima BH10, como por ejemplo L74V, D76I, D76R, D76V y R78A (Rubinek *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998, 1999; Shah *et al.*, 2000). Sin embargo, las RTs que presentan estos cambios son relativamente poco eficaces desde un punto de vista catalítico.

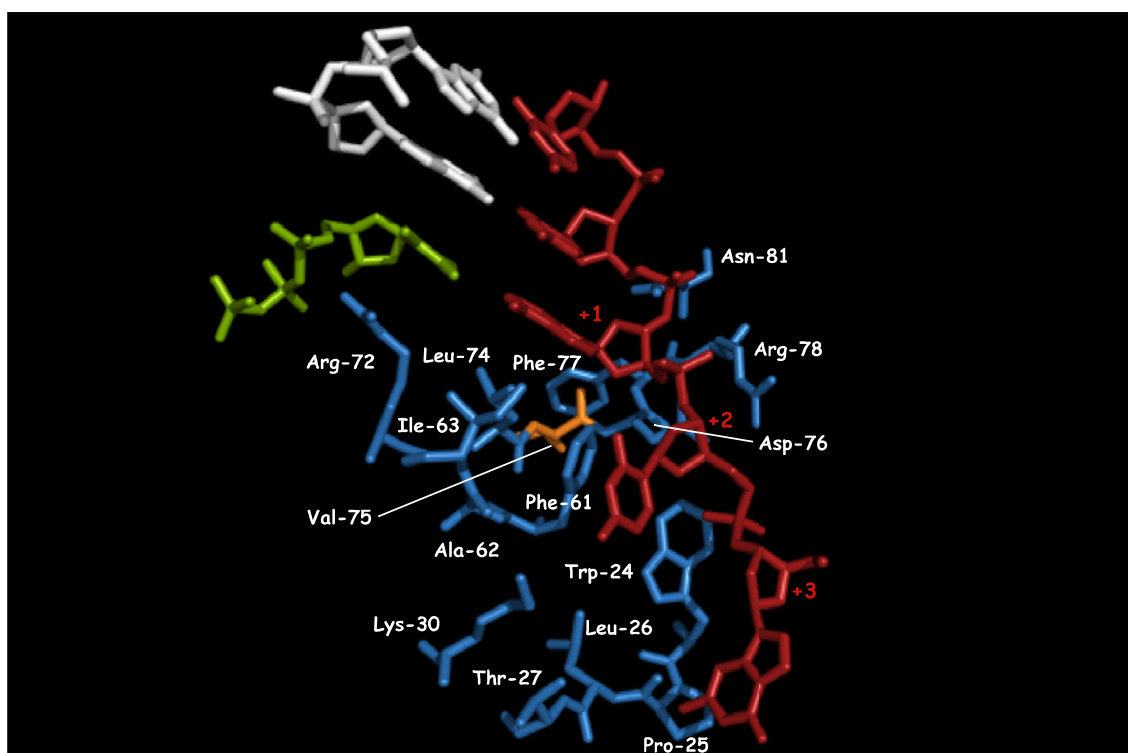


Figura 29. Aminoácidos de la RT del VIH-1 que presentan mayor superficie de contacto con los nucleótidos +1, +2 y +3 de la región desapareada del molde. Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados aparecen en azul. La Val-75 se representa en naranja. En rojo se muestra el molde y en blanco el iniciador. En verde se indica el nucleótido entrante. Esta figura se ha realizado con el programa "PyMOL Molecular Graphics System" (DeLano Scientific).

Aunque se dispone de información puntual sobre el efecto en la fidelidad de copia de residuos que interaccionan con el extremo 5' desapareado del molde, el papel de la mayoría de los aminoácidos indicados en la [Figura 29](#) no ha sido estudiado, a pesar de incluir posiciones relevantes de cara al estudio de resistencia a fármacos antirretrovirales, como Val-75.

El análisis de las estructuras cristalográficas publicadas revela que la Val-75 se encuentra en la base del subdominio "fingers", a más de 16 Å de los aspárticos catalíticos del centro activo de la RT. La cadena lateral de la Val-75 interacciona con la parte interna del subdominio "fingers", concretamente con las cadenas laterales de Val-60, Lys-73 y Tyr-146. ([Huang *et al.*, 1998](#); [Selmi *et al.*, 2001a](#)). El esqueleto peptídico de este aminoácido contacta con la parte desapareada del molde a través de la interacción entre su grupo -CO- y el nucleótido de la posición +1, mientras que su grupo -NH- interacciona con el esqueleto peptídico de la Gln-151. Estas observaciones sugieren que la sustitución de la cadena lateral de este aminoácido podría influir en la topología del esqueleto carbonado que interacciona con el extremo

5' desapareado del molde y por tanto podría tener un efecto en la especificidad de nucleótido.

Por todo ello, nos planteamos estudiar el papel de la Val-75 en la fidelidad de copia de la RT, para lo cual se introdujeron una serie de cambios en esta posición. Los cambios de aminoácido introducidos fueron: V75A, V75F, V75I, V75L, V75M, V75S y V75T, y las RTs mutantes correspondientes se caracterizaron mediante ensayos bioquímicos y genéticos.

4.3.1 Efecto de la sustitución de la Val-75 sobre la actividad polimerasa de la RT del VIH-1

Para conocer el efecto de las sustituciones de aminoácido sobre la actividad DNA polimerasa de la RT, se determinaron las eficacias catalíticas (k_{cat}/K_m) de las RTs mutantes que contienen Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Ser o Thr en vez de Val en la posición 75, y de la RT BH10, para la unión de dTTP utilizando el complejo heteropolimérico D2-47/PG5-25, en condiciones de estado estacionario.

Tabla 7. Parámetros cinéticos en el estado estacionario para la incorporación de dTTP por la RT BH10 y las RTs mutantes con cambios de aminoácido en la posición 75.

Enzima	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
BH10	$3,71 \pm 0,08$	$0,0579 \pm 0,009$	$64,07 \pm 10,05$
BH10_V75A	$4,30 \pm 0,18$	$0,156 \pm 0,038$	$27,56 \pm 6,81$
BH10_V75F	$4,87 \pm 0,15$	$0,219 \pm 0,045$	$22,23 \pm 4,62$
BH10_V75I	$4,10 \pm 0,15$	$0,153 \pm 0,045$	$26,80 \pm 7,94$
BH10_V75L	$4,67 \pm 0,21$	$0,153 \pm 0,041$	$30,52 \pm 8,29$
BH10_V75M	$3,72 \pm 0,06$	$0,115 \pm 0,012$	$32,35 \pm 3,41$
BH10_V75S	$5,49 \pm 0,21$	$0,133 \pm 0,034$	$41,28 \pm 10,67$
BH10_V75T	$5,29 \pm 0,19$	$0,168 \pm 0,043$	$31,49 \pm 8,14$

La concentración de complejo D2-47/PG5-25 utilizada fue de 30 nM. Los datos se muestran como media \pm desviaciones estándar obtenidas de los datos cinéticos mediante un ajuste de mínimos cuadrados a la ecuación de Michaelis-Menten. Cada experimento se realizó al menos dos veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

Como se muestra en la **Tabla 7**, estas sustituciones produjeron una reducción moderada de la eficacia catalítica de todos los mutantes respecto a la enzima BH10. No se apreciaron diferencias importantes en los valores de k_{cat} obtenidos para los

mutantes y la RT BH10. La disminución de la eficacia catalítica observada con las RTs mutantes fue debida al aumento, entre 2 y 3,8 veces, de los valores de K_m para el dTTP en relación a la RT BH10.

4.3.2 Extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP

Este tipo de ensayos permite medir de forma cualitativa los efectos de las mutaciones introducidas en la posición 75 sobre la incorporación de nucleótidos incorrectos y su posterior extensión durante la síntesis de DNA.

El ensayo se realizó usando dos complejos molde-iniciador diferentes: M54/3TRP (Figura 30) y D2-47/PG5-25 (Figura 31) a una concentración de 30 nM, y las enzimas RT BH10 y todos los mutantes en la posición 75.

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos cuando se usó como complejo molde-iniciador M54/3TRP. Todas las RTs analizadas fueron capaces de llevar a cabo extensiones totales en presencia de los cuatro dNTPs. Las enzimas BH10_V75L, BH10_V75M y BH10_V75S presentaron un patrón de bandas muy similar al de la enzima BH10. En cambio, se observaron algunas diferencias con los mutantes BH10_V75A, BH10_V75F, BH10_V75I y BH10_V75T. Por ejemplo, en las reacciones llevadas a cabo en ausencia de dGTP (pocillos -G) los productos obtenidos con los mutantes BH10_V75F, BH10_V75I y BH10_V75T fueron ligeramente más cortos que los obtenidos con la enzima BH10. Por el contrario, el mutante BH10_V75A presentó productos ligeramente más largos tanto en ausencia de este nucleótido como en ausencia de dATP (pocillo -A) (ver flechas en la Figura 30).

Por otro lado, en la reacción catalizada por el mutante BH10_V75I, en ausencia de dATP (pocillo -A), se observó una acumulación de producto en la posición +1 bastante mayor que la observada para la RT BH10 (ver flechas en la Figura 30). La reacción realizada por la RT BH10_V75F en ausencia de dTTP mostró al cabo de 5 min una acumulación de producto principalmente en la posición +5, a diferencia de la RT BH10, que en las mismas condiciones, acumula el producto en la posición +8.

Puesto que no se observaron grandes diferencias entre los mutantes y la RT BH10 en las extensiones del iniciador 3TRP, para confirmar los resultados anteriores se llevó a cabo el mismo experimento en un contexto de secuencia diferente. Se utilizó

para ello el complejo molde-iniciador D2-47/PG5-25. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 31**. Tanto los mutantes como la RT BH10 fueron capaces de extender totalmente el iniciador cuando todos los dNTPs requeridos estaban presentes en la reacción. Ya que el molde carece de citosina en su secuencia sólo fueron necesarios tres dNTPs (dATP + dCTP + dTTP) para conseguir extensiones totales. El patrón de bandas observado para los mutantes BH10_V75L, BH10_V75M y BH10_V75S fue muy similar al obtenido con la RT BH10. Sin embargo, fue algo distinto para los mutantes BH10_V75A, BH10_V75F, BH10_V75I y BH10_V75T.

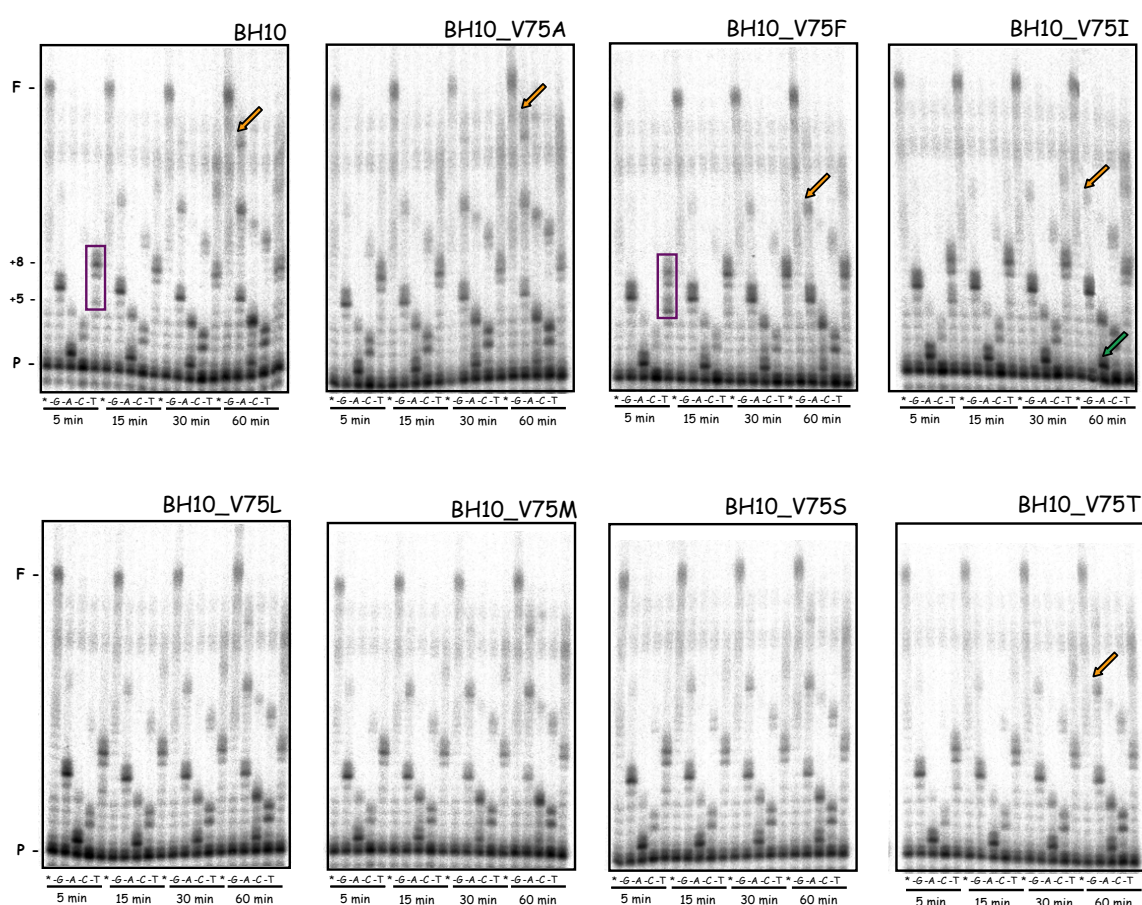


Figura 30. Extensión de iniciador 3TRP por la RT BH10 y los mutantes en la posición Val-75. Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando un molde de DNA (M54) y en ausencia de un dNTP complementario. Con un asterisco (*) se indican los pocillos en los que la mezcla de dNTPs contiene los 4 nucleótidos. Las columnas marcadas con -G, -A, -C y -T indican la ausencia de ese nucleótido en la mezcla. Se tomaron alícuotas tras 5, 15, 30 y 60 min de reacción. P y F indican la posición del iniciador de 22 nucleótidos de longitud sin elongar y de la extensión total de 54 nucleótidos, respectivamente. Las bandas destacadas en las posiciones +5 y +8 representan las paradas después de la incorporación de 5 y 8 nucleótidos, respectivamente. Las flechas se usan para indicar paradas específicas de los mutantes en la Val-75. Las cajas se usan para destacar diferencias entre la RT BH10 y el mutante BH10_V75F

En las reacciones realizadas en ausencia de dATP, cuando la enzima utilizada fue BH10_V75A, se observó una acumulación de iniciador totalmente elongado mayor

que para la RT BH10, particularmente después de incubar a tiempos largos (comparar las intensidades de las bandas en la posición +7 para el mutante BH10_V75A y la enzima BH10). Por el contrario, cuando las reacciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones pero en presencia de los mutantes BH10_V75F, BH10_V75I y BH10_V75T los productos obtenidos fueron más cortos. En las reacciones catalizadas por el mutante BH10_V75F, la acumulación de productos totalmente elongados fue más lenta que en las catalizadas por la RT BH10 (flechas en la [Figura 31](#)). Este mismo efecto se observó con los mutantes BH10_V75I y BH10_V75T, aunque en este caso la diferencia mayor se observó al comparar las intensidades de las bandas +4 y +7 a los tiempos más cortos (5 y 15 min).

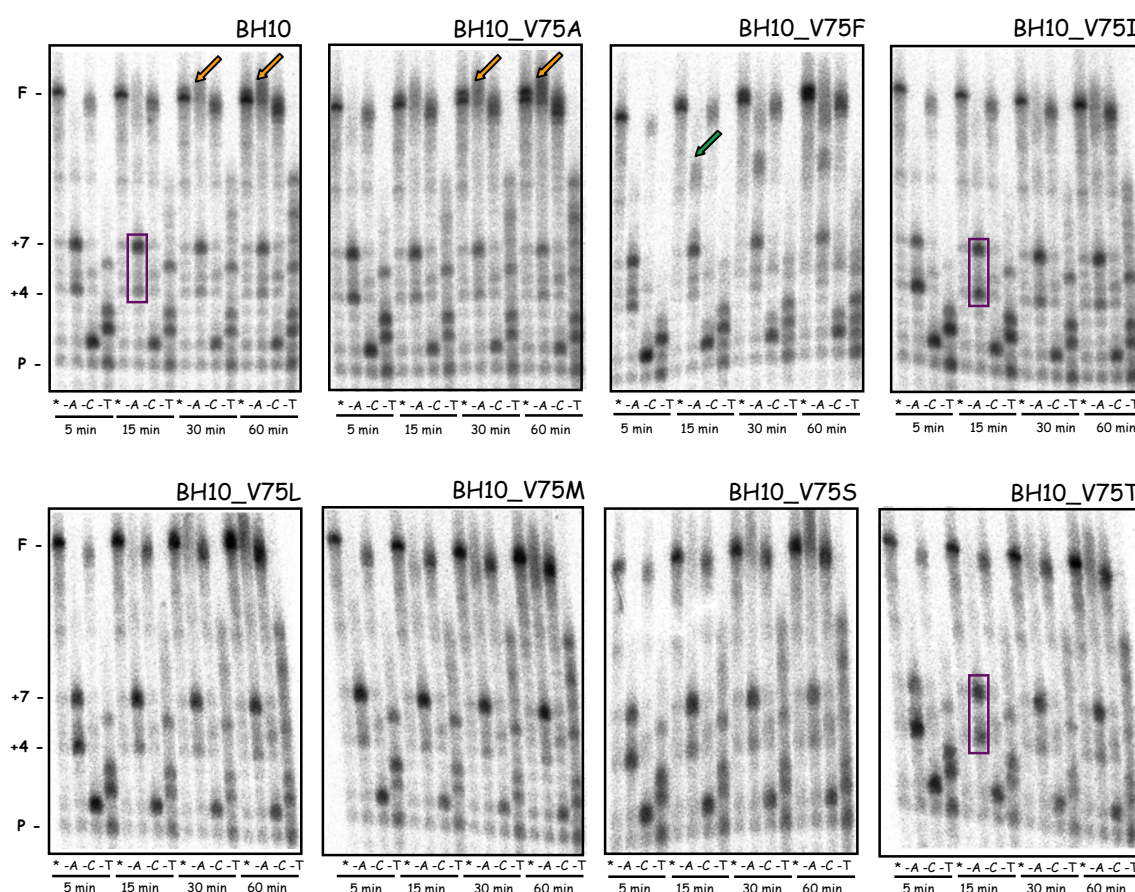


Figura 31. Extensión de iniciador PG5-25 por la RT BH10 y los mutantes en la posición Val-75. Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando un molde de DNA (D2-47) y en ausencia de un dNTP complementario. Con un asterisco (*) se indican los pocillos en los que se incluyen los 3 nucleótidos necesarios para la extensión total. Las columnas marcadas con -A, -C y -T indican la ausencia de ese nucleótido en la mezcla. Se tomaron alícuotas tras 5, 15, 30 y 60 min de reacción. P y F indican la posición del iniciador de 25 nucleótidos de longitud sin elongar y de la extensión total de 47 nucleótidos, respectivamente. Las bandas destacadas en las posiciones +4 y +7 representan las paradas después de la incorporación de 4 y 7 nucleótidos, respectivamente. Las flechas se usan para indicar paradas específicas de los mutantes en la Val-75. Las cajas se usan para destacar diferencias entre la RT BH10 y los mutantes BH10_V75I y BH10_V75T.

Estos resultados sugieren que los mutantes BH10_V75F, BH10_V75I y BH10_V75T podrían ser más fieles que la RT BH10, mientras que BH10_V75A conferiría una fidelidad de copia reducida.

4.3.2.1 Efecto de Be^{2+} y Mn^{2+} sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1

Se cree que todas las DNA polimerasas utilizan dos cationes metálicos para llevar a cabo la reacción de polimerización. Estos dos iones metálicos situados en el centro activo de las polimerasas, se encuentran a una distancia aproximada de 4 Å. Posiblemente el metal catalítico (metal A) esté implicado en la reacción nucleofílica, mientras que el metal de unión al nucleótido (metal B) coordine el grupo trifosfato del dNTP entrante y facilite la disociación del PPI. Aunque el Mg^{2+} sea el catión divalente más utilizado por la mayoría de las polimerasas para llevar a cabo la catálisis *in vivo*, las DNA polimerasas son capaces de utilizar otros cationes divalentes, principalmente el Mn^{2+} . Sin embargo, se sabe que cationes divalentes como Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Be^{2+} alteran la selectividad de nucleótido y la fidelidad de copia en reacciones catalizadas por DNA polimerasas (Sirover y Loeb 1976; Beckman *et al.*, 1985; Snow *et al.*, 1993; Sabbioni *et al.*, 1999; Cases-González *et al.*, 2000).

Para analizar el efecto de los cationes divalentes, Mn^{2+} y Be^{2+} sobre la fidelidad de copia de la RT del VIH-1, se realizaron ensayos de extensión de iniciadores en presencia de tres dNTPs. Con estos ensayos se obtuvo una idea cualitativa de los efectos que producen estos cationes divalentes en la fidelidad de esta polimerasa. Se utilizó para ello el complejo molde-iniciador M54/3TRP y las enzimas BH10 y BH10_V75I.

Recientemente se han publicado estudios de dinámica molecular que han demostrado que la presencia del Mg^{2+} catalítico (sitio A) es crítica para que la distancia entre el OH del extremo 3' del iniciador y el oxígeno no enlazante del fosfato α del dNTP entrante sea adecuada para que tenga lugar el ataque nucleofílico (Figura 32) (Mendieta *et al.*, 2007). Además, mediante ensayos cinéticos en estado pre-estacionario, se confirmó que el Mg^{2+} catalítico (sitio A) es necesario para que se forme un complejo catalíticamente competente. Sin embargo, el Be^{2+} presentó un efecto dual, a bajas concentraciones de Be^{2+} la RT aumenta su eficacia catalítica, mientras que a altas concentraciones éste compite con el Mg^{2+} en la unión al sitio A provocando la inhibición de la actividad DNA polimerasa de la RT (Mendieta *et al.*,

2007). Por esta razón es necesaria la presencia de Mg^{2+} en el medio, cuando se utiliza Be^{2+} como cofactor.

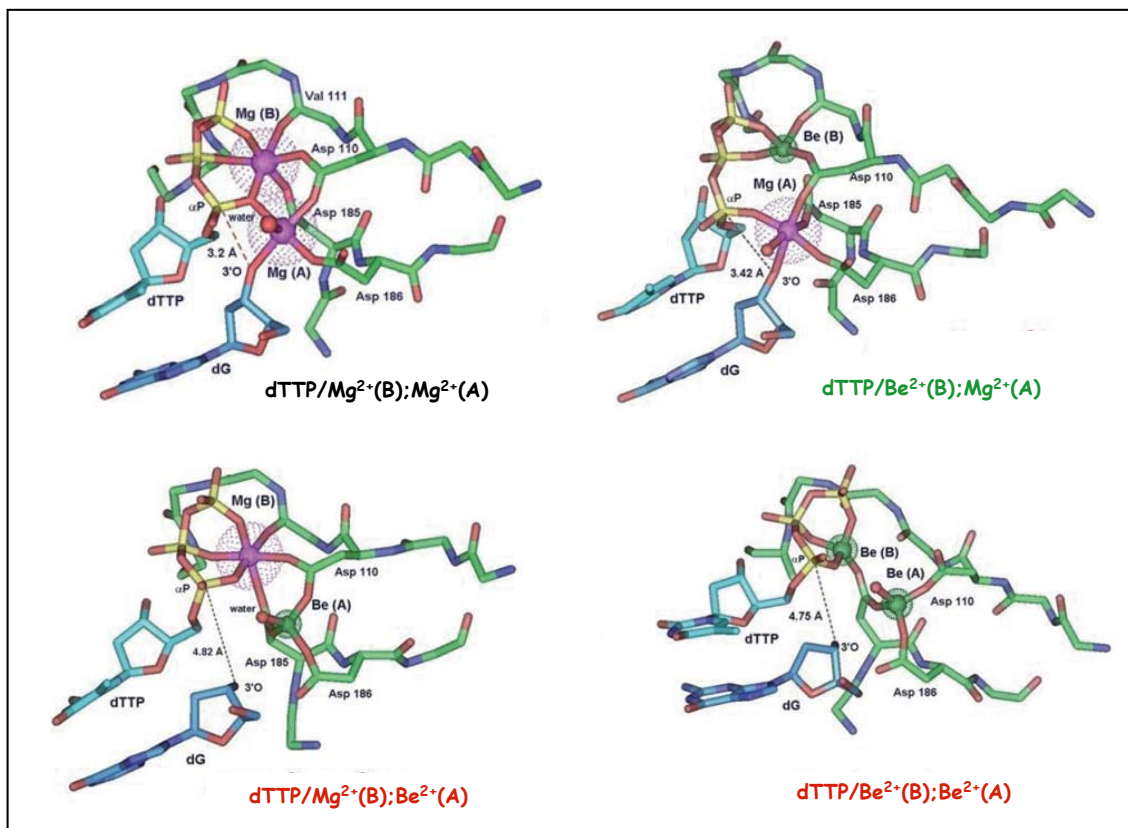


Figura 33. Vista detallada del centro activo de la RT del VIH-1 en complejos ternarios simulados, que contienen Mg^{2+} y/o Be^{2+} en los sitios A, B o ambos. Se muestran las distancias interatómicas entre el O del extremo 3' del iniciador y el fósforo α del dTTP entrante. Esta figura ha sido adaptada de Mendieta *et al.* (2007).

Tanto en presencia de Mn^{2+} como de Be^{2+} las RTs analizadas fueron capaces de llevar a cabo extensiones totales en presencia de los cuatro dNTPs. En las reacciones llevadas a cabo en presencia de Mn^{2+} se observó que los productos, tanto con la RT BH10 como con el mutante BH10_V75I, fueron más cortos en ausencia de dTTP (-T). Por el contrario, en ausencia de dATP (-A) la acumulación de productos totalmente elongados fue más rápida que cuando las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de Mg^{2+} , para las dos RTs analizadas. Sin embargo, en las reacciones catalizadas por el mutante BH10_V75I, se observaron diferencias respecto a la RT BH10. Así, los productos obtenidos en ausencia de dCTP (-C) eran significativamente más cortos en las reacciones llevadas a cabo con BH10_V75I en presencia de Mn^{2+} (Figura 33), lo que apoya la hipótesis de que la mutación V75I aumenta la fidelidad de la RT.

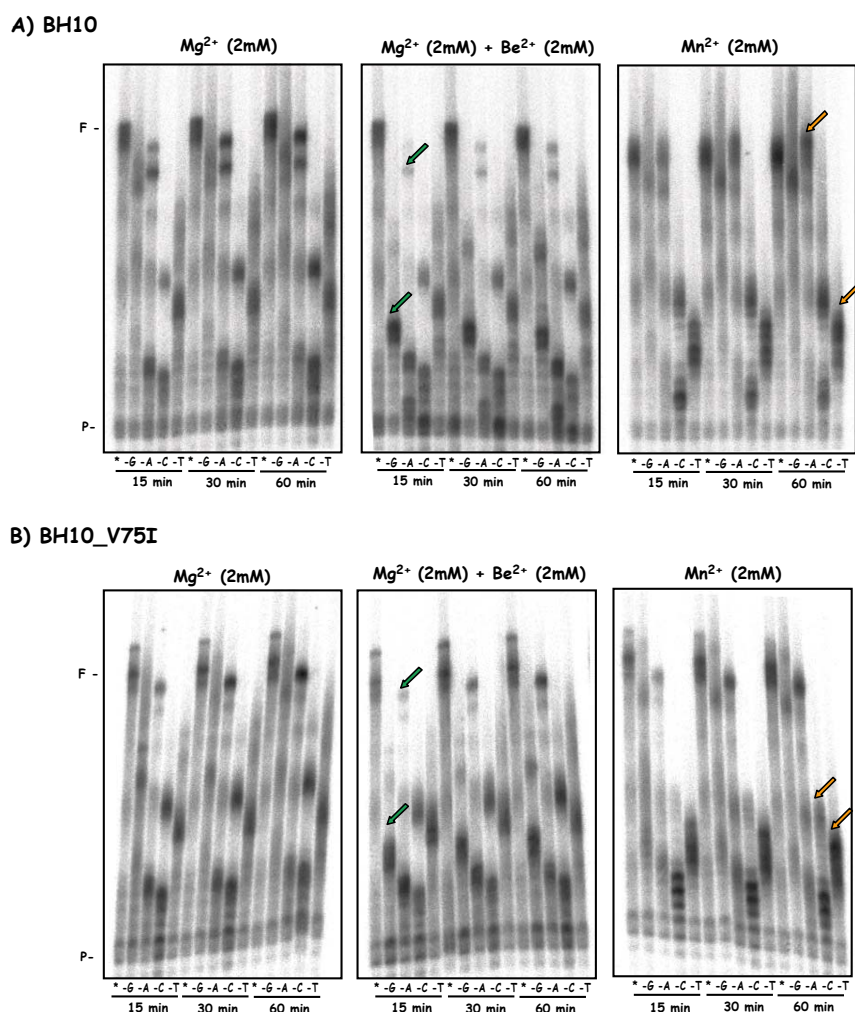


Figura 33. Extensión del iniciador 3TRP por la RT BH10 (A) y el mutante BH10_V75I (B), en presencia de Mg^{2+} , Be^{2+} o Mn^{2+} . Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando un molde de DNA (M54), en ausencia de un dNTP complementario. Con un asterisco (*) se indican los pocillos en los que la mezcla de dNTPs contiene los 4 nucleótidos. Las columnas marcadas con -G, -A, -C y -T indican la ausencia de ese nucleótido en la mezcla. Se tomaron alícuotas tras 15, 30 y 60 min de reacción. P y F indican la posición del iniciador de 22 nucleótidos de longitud y la del producto resultante de la extensión total de 54 nucleótidos, respectivamente.

En las reacciones llevadas a cabo con la RT BH10 en presencia de Be^{2+} , se observaron productos más cortos tanto en ausencia de dGTP (-G) como de dATP (-A) en todos los tiempos analizados. Cuando la enzima que catalizaba la reacción era BH10_V75I el efecto fue similar (Figura 33). Estos resultados nos indican que el Be^{2+} podría aumentar la fidelidad de copia de la RT del VIH-1.

4.3.3 Determinación de la fidelidad de copia de DNA en el estado estacionario

Las determinaciones de fidelidad de copia en el estado estacionario se llevaron a cabo con la RT BH10 y los mutantes BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I, ya que

éstos fueron los que presentaron mayores diferencias respecto a la RT BH10 en los ensayos de extensión en ausencia de un dNTP.

4.3.3.1 Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos

En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador D2-47/PG5-25 para medir los parámetros cinéticos de incorporación de un nucleótido correcto (dTTP) o de un nucleótido incorrecto (dCTP, dGTP o dATP), en el extremo 3' del iniciador. Los resultados obtenidos se muestran en la [Tabla 8](#).

Tabla 8. Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos correctos e incorrectos sobre el complejo molde-iniciador D2-47/PG5-25 para la RT BH10 y los mutantes de la posición 75, determinados en el estado estacionario.

Enzima	Nucleótido	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Frecuencia de incorporación errónea f_{ins}^a
BH10	dTTP	$3,71 \pm 0,08$	$0,0579 \pm 0,009$	$64,07 \pm 10,05$	
	dCTP	$1,50 \pm 0,09$	755 ± 135	$(1,99 \pm 0,37) \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-5}$
	dGTP	$1,54 \pm 0,11$	542 ± 136	$(2,84 \pm 0,74) \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-5}$
	dATP	$(7,3 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	ND ^b	ND	ND
BH10_V75A	dTTP	$4,30 \pm 0,18$	$0,156 \pm 0,038$	$27,56 \pm 6,81$	
	dCTP	$1,49 \pm 0,10$	298 ± 72	$(5,00 \pm 1,25) \times 10^{-3}$	$1,81 \times 10^{-4}$
	dGTP	$1,19 \pm 0,08$	305 ± 97	$(3,90 \pm 1,27) \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-4}$
	dATP	$(11,1 \pm 0,6) \times 10^{-3}$	ND	ND	ND
BH10_V75F	dTTP	$4,87 \pm 0,15$	$0,219 \pm 0,045$	$22,23 \pm 4,62$	
	dCTP	$0,85 \pm 0,08$	711 ± 292	$(1,19 \pm 0,50) \times 10^{-3}$	$5,35 \times 10^{-5}$
	dGTP	$1,27 \pm 0,08$	486 ± 133	$(2,61 \pm 1,58) \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-4}$
	dATP	ND	ND	ND	ND
BH10_V75I	dTTP	$4,10 \pm 0,15$	$0,153 \pm 0,045$	$26,80 \pm 7,94$	
	dCTP	$1,30 \pm 0,25$	882 ± 145	$(1,47 \pm 0,37) \times 10^{-3}$	$5,48 \times 10^{-5}$
	dGTP	$2,10 \pm 0,43$	808 ± 146	$(2,59 \pm 0,71) \times 10^{-3}$	$9,66 \times 10^{-5}$
	dATP	$(5,8 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	ND	ND	ND

La concentración del complejo D2-47PG5-25 utilizada en el ensayo fue de 30 nM. Las reacciones de elongación se incubaron a 37°C durante 20 s para el dTTP, 45-90 s para dCTP y dGTP, y 60 min para dATP. Los datos mostrados son las medias \pm desviaciones estándar obtenidas de los datos cinéticos mediante un ajuste de mínimos cuadrados a la ecuación de Michaelis-Menten. Cada experimento se realizó al menos dos veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

^a $f_{ins} = [k_{pol}(\text{incorrecto})/K_d(\text{incorrecto}) / k_{pol}(\text{correcto})/K_d(\text{correcto})]$, donde el nucleótidos incorrectos fueron dCTP, dGTP, o dATP, mientras que el nucleótido correcto fue dTTP.

^bND, no determinado.

Las eficiencias de incorporación (f_{inc}) obtenidas para los nucleótidos incorrectos dCTP y dGTP, y para las cuatro enzimas analizadas, se encuentran en un rango comprendido entre $3,10 \times 10^{-5}$ y $1,81 \times 10^{-4}$. En general, estos valores fueron algo mayores para las RTs mutantes que para la RT BH10. La diferencia más significativa se observó con el mutante BH10_V75A, que mostró una eficiencia de incorporación errónea para el dCTP 5,8 veces superior que la obtenida con la RT BH10. Todas las enzimas fueron muy ineficaces en la incorporación de dATP, por lo que no fue posible obtener parámetros cinéticos para este nucleótido.

4.3.3.2 Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados

Se determinaron los parámetros cinéticos en el estado estacionario de la enzima BH10 y los mutantes BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I, para la incorporación del nucleótido correcto (dTTP) en complejos molde-iniciador con el extremo 3' desapareado (D2-47/PG5-25C, D2-47/PG5-25G y D2-47/PG5-25A). Los resultados se muestran en la [Tabla 9](#).

Aunque las constantes catalíticas obtenidas para la RT BH10 y para el mutante BH10_V75A no mostraron grandes diferencias, se observó un aumento de 2,5 a 3 veces en las eficiencias de extensión (f_{ext}) del mutante para los extremos desapareados A:G y A:A. Estos datos están en concordancia con la menor fidelidad observada para BH10_V75A en los ensayos de incorporación errónea.

Por otro lado, los mutantes BH10_V75F y BH10_V75I mostraron frecuencias de extensión de 3 a 5 veces menores que las obtenidas con la RT BH10. Este efecto se observó con los tres extremos desapareados estudiados, y se puede atribuir al aumento significativo en los valores de la K_m aparente obtenidos en estas reacciones.

4.3.4 Determinación de la fidelidad de copia de DNA en el estado pre-estacionario

Los parámetros cinéticos determinados en el estado estacionario no permiten sacar conclusiones acerca del mecanismo de la reacción, ya que no se puede determinar de forma precisa ni la constante de afinidad de unión para el nucleótido entrante (K_d), ni la velocidad máxima de incorporación de éste (k_{pol}). Esto se debe a que, bajo las condiciones de estado estacionario, la afinidad de la enzima por el

nucleótido es dependiente de la tasa de disociación de la enzima y el complejo molde-iniciador (k_{off}). Esta dependencia viene dada por la ecuación: $K_m = K_d(k_{\text{off}}/k_{\text{pol}})$ (Wilson *et al.*, 1996). Por esta razón, se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos en el estado preestacionario de la enzima BH10 y los mutantes BH10_V75A, BH10_V75F y BH10_V75I.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados sobre el complejo molde-iniciador D2-47/PG5-25 para la RT BH10 y los mutantes de la posición 75 determinados en el estado estacionario

Enzima	Par de bases en posición 3 ^a	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ min ⁻¹)	Frecuencia de extensión de extremos desapareados f_{ext}^b
BH10	A:T	3,71 ± 0,08	0,0579 ± 0,009	64,07 ± 10,05	
	A:C	4,41 ± 0,12	2,77 ± 0,46	1,592 ± 0,268	0,025
	A:G	0,113 ± 0,007	75,8 ± 20,1	(1,49 ± 0,40) × 10 ⁻³	2,32 × 10 ⁻⁵
	A:A	0,081 ± 0,005	62,7 ± 14,4	(1,29 ± 0,31) × 10 ⁻³	2,01 × 10 ⁻⁵
BH10_V75A	A:T	4,30 ± 0,18	0,156 ± 0,038	27,56 ± 6,81	
	A:C	4,35 ± 0,14	5,67 ± 0,72	0,767 ± 0,100	0,028
	A:G	0,155 ± 0,006	80,1 ± 14,4	(1,94 ± 0,36) × 10 ⁻³	7,04 × 10 ⁻⁵
	A:A	0,071 ± 0,004	51,3 ± 12,1	(1,38 ± 0,34) × 10 ⁻³	5,00 × 10 ⁻⁵
BH10_V75F	A:T	4,87 ± 0,15	0,219 ± 0,045	22,23 ± 4,62	
	A:C	5,90 ± 0,37	37,6 ± 8,7	0,156 ± 0,038	7,02 × 10 ⁻³
	A:G	0,051 ± 0,005	368 ± 131	(1,39 ± 0,51) × 10 ⁻⁴	6,25 × 10 ⁻⁶
	A:A	0,041 ± 0,003	282 ± 74	(1,45 ± 0,39) × 10 ⁻⁴	6,52 × 10 ⁻⁶
BH10_V75I	A:T	4,10 ± 0,15	0,153 ± 0,045	26,80 ± 7,94	
	A:C	4,26 ± 0,21	32,3 ± 6,5	0,132 ± 0,027	4,93 × 10 ⁻³
	A:G	0,076 ± 0,003	374 ± 44	(2,03 ± 0,25) × 10 ⁻⁴	7,57 × 10 ⁻⁶
	A:A	0,055 ± 0,005	342 ± 95	(1,61 ± 0,47) × 10 ⁻⁴	6,01 × 10 ⁻⁶

La concentración del complejo D2-47/PG5-25 utilizada en el ensayo fue de 30 nM. Las reacciones de elongación se incubaron a 37°C durante 20 s para los extremos A:T y A:C, y 15-40 min para los extremos A:G y A:A. En todos los casos se midió la incorporación de T frente a A en la posición +1. Los datos mostrados son las medias ± desviaciones estándar obtenidas de los datos cinéticos mediante un ajuste de mínimos cuadrados a la ecuación de Michaelis-Menten. Cada experimento se realizó al menos dos veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

^a La primera base corresponde al molde y la segunda al iniciador.

^b $f_{\text{ext}} = [k_{\text{cat}}(\text{desapareado})/K_m(\text{desapareado}) / k_{\text{cat}}(\text{apareado})/K_m(\text{apareado})]$

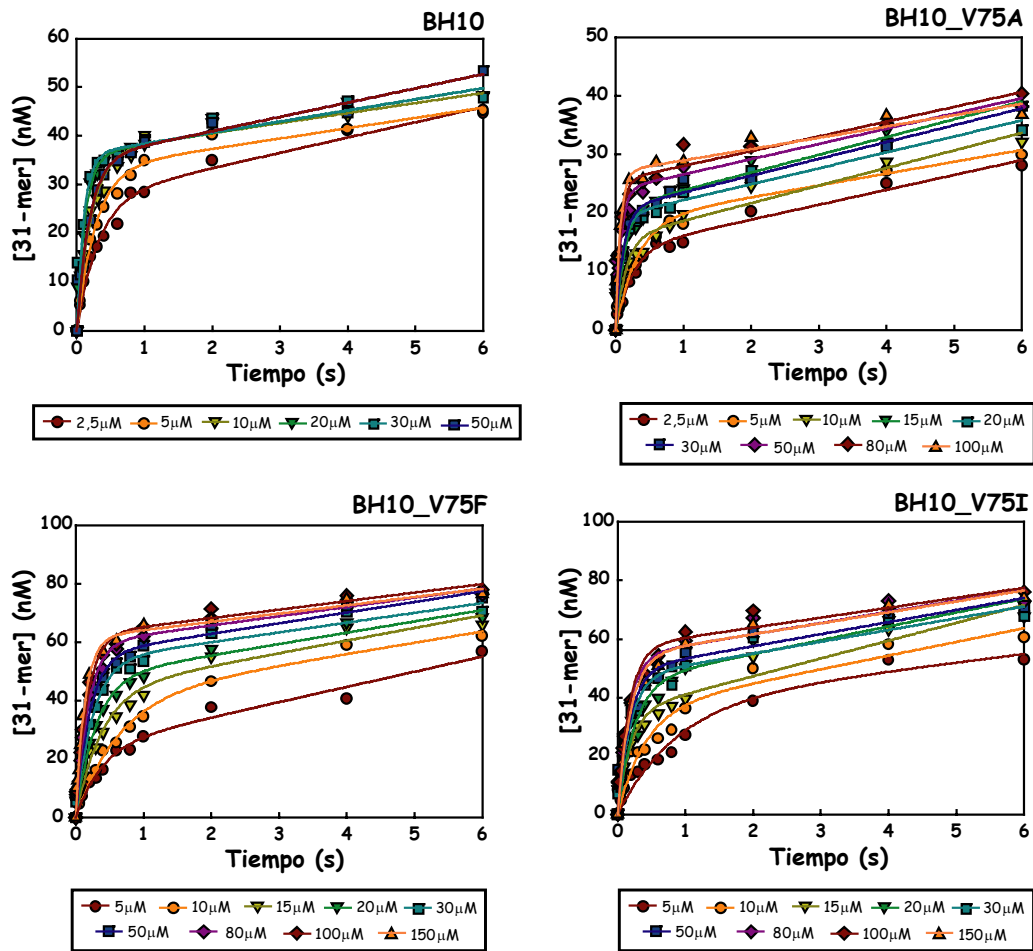
4.3.4.1 Discriminación entre dNTPs correctos e incorrectos.

En estos ensayos se utilizó el complejo 31T/21P. Las cinéticas de incorporación del nucleótido correcto (dTTP) sobre el complejo 31T/21P para las cuatro enzimas estudiadas, se muestran en la [Figura 34A](#). La velocidad de incorporación del nucleótido (k_{obs}) se determinó usando distintas concentraciones de dNTP. La naturaleza bifásica de estas reacciones indica que el paso limitante de la catálisis sucede después de la reacción química. Por ejemplo, en el caso de la enzima BH10, la reacción de incorporación mostró una fase rápida con velocidades entre 3 y 11 s^{-1} , y una fase lenta (estado estacionario) con una velocidad de 0,089 s^{-1} . Este valor de velocidad de la fase lenta es consistente con el valor de k_{cat} obtenido para esta enzima (véase [Tabla 8](#)).

La dependencia de la velocidad de la reacción (k_{obs}) con la concentración de nucleótido, se analizó ajustando los datos a una ecuación hiperbólica. Así, se obtuvo la velocidad máxima de incorporación del dNTP (k_{pol}) y la constante de afinidad de unión del dNTP (K_{d}) ([Figura 34B](#)) para las cuatro enzimas en estudio. En la [Tabla 10](#) se muestran estos parámetros cinéticos obtenidos en el estado preestacionario. Todas las enzimas presentaron eficacias catalíticas similares para la incorporación de nucleótido correcto, excepto el mutante BH10_V75F, cuyo valor de $k_{\text{pol}}/K_{\text{d}}$ fue menor, debido tanto a un descenso de la k_{pol} como a un aumento de la K_{d} , respecto a la RT BH10.

Las cinéticas de incorporación de los nucleótidos incorrectos (dCTP y dGTP) en el complejo 31T/21P se realizaron bajo condiciones de “single turnover”, donde la enzima (RT 120nM) se encontraba en exceso respecto al complejo molde-iniciador (31T/21P 100nM). La cantidad de producto elongado fue representada frente al tiempo, donde los valores obtenidos se ajustaron a una curva exponencial simple para obtener las velocidades de incorporación (k_{obs}) de dCTP ([Figura 35A](#)) y dGTP ([Figura 35B](#)). Los parámetros cinéticos, k_{pol} y K_{d} se obtuvieron de la representación de los valores de k_{obs} frente a la concentración de nucleótido y ajustando los datos a una hipérbola ([Figura 35C](#)). Las frecuencias de incorporación errónea de dCTP y dGTP presentaron valores en un rango de $1,7 \times 10^{-5}$ a $9,7 \times 10^{-5}$. Las diferencias entre los mutantes y la RT BH10 fueron relativamente pequeñas. La única diferencia significativa se observó con el mutante BH10_V75I, que presentó una eficiencia de incorporación errónea 2,6 veces menor que la RT BH10, para la incorporación de dCTP.

A



B

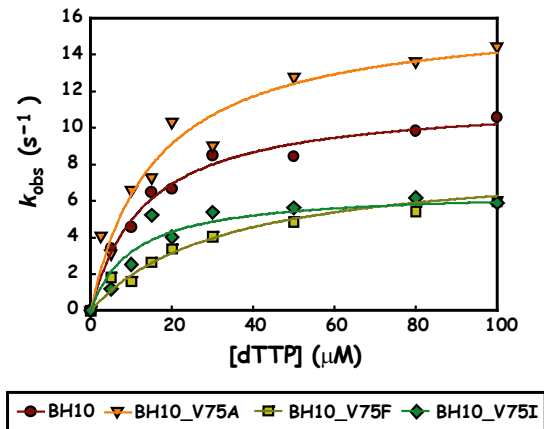


Figura 34. Cálculo de parámetros cinéticos para la incorporación del nucleótido correcto en el estado preestacionario. (A) Cinéticas de incorporación del nucleótido correcto sobre un complejo 31T/21P en estado preestacionario. A una mezcla preincubada de la RT (50 nM) y $[5^{32}P]31T/21P$ (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes de nucleótido en un tampón que contenía Mg^{2+} a 12 mM. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron mediante geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación $[P] = A \times [1 - \exp(-k_{obs} \times t)] + k_{ss} \times t$, descrita en Materiales y Métodos. **(B)** Dependencia con la concentración de la incorporación de dTTP en un complejo 31T/21P por la RT BH10 y los mutantes analizados. Las velocidades de primer orden (k_{obs}) obtenidas de los ajustes del panel A se representaron frente a la concentración de dTTP. Los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica: $k_{obs} = k_{pol} \times [dTTP] / (K_d + [dTTP])$, descrita en Materiales y Métodos. Así, se obtuvieron los parámetros cinéticos k_{pol} y K_d . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos correctos e incorrectos para la RT BH10 y los mutantes de la posición 75, determinados en el estado pre-estacionario.

Enzima	Nucleótido	k_{pol} (s^{-1})	K_d (μM)	k_{pol}/K_d ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	Frecuencia de incorporación errónea f_{ins}^a
BH10	dTTP	$11,57 \pm 0,49$	$13,40 \pm 1,88$	$0,863 \pm 0,126$	
	dCTP	$0,2911 \pm 0,0524$	7645 ± 2959	$(3,80 \pm 1,62) \times 10^{-5}$	$4,40 \times 10^{-5}$
	dGTP	$0,2885 \pm 0,0323$	3435 ± 1099	$(8,40 \pm 2,84) \times 10^{-5}$	$9,73 \times 10^{-5}$
BH10_V75A	dTTP	$15,23 \pm 1,45$	$16,30 \pm 4,96$	$0,934 \pm 0,298$	
	dCTP	$0,1776 \pm 0,0094$	4170 ± 734	$(4,26 \pm 0,78) \times 10^{-5}$	$4,58 \times 10^{-5}$
	dGTP	$0,1532 \pm 0,0080$	2271 ± 446	$(6,74 \pm 1,37) \times 10^{-5}$	$7,22 \times 10^{-5}$
BH10_V75F	dTTP	$8,36 \pm 0,65$	$33,25 \pm 6,91$	$0,251 \pm 0,056$	
	dCTP	$0,0570 \pm 0,0019$	7067 ± 594	$(8,06 \pm 0,73) \times 10^{-6}$	$3,22 \times 10^{-5}$
	dGTP	$0,1351 \pm 0,0249$	11006 ± 3537	$(1,23 \pm 0,45) \times 10^{-5}$	$4,90 \times 10^{-5}$
BH10_V75I	dTTP	$7,86 \pm 0,88$	$12,07 \pm 4,64$	$0,651 \pm 0,261$	
	dCTP	$0,1749 \pm 0,0233$	16116 ± 3666	$(1,08 \pm 0,29) \times 10^{-5}$	$1,66 \times 10^{-5}$
	dGTP	$0,4080 \pm 0,0411$	12741 ± 1970	$(3,20 \pm 0,59) \times 10^{-5}$	$4,92 \times 10^{-5}$

Se usó el complejo 31T/21P como sustrato. Las condiciones experimentales se detallan en la Figuras 34 y 35. Los datos se muestran como el valor \pm desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos dos veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

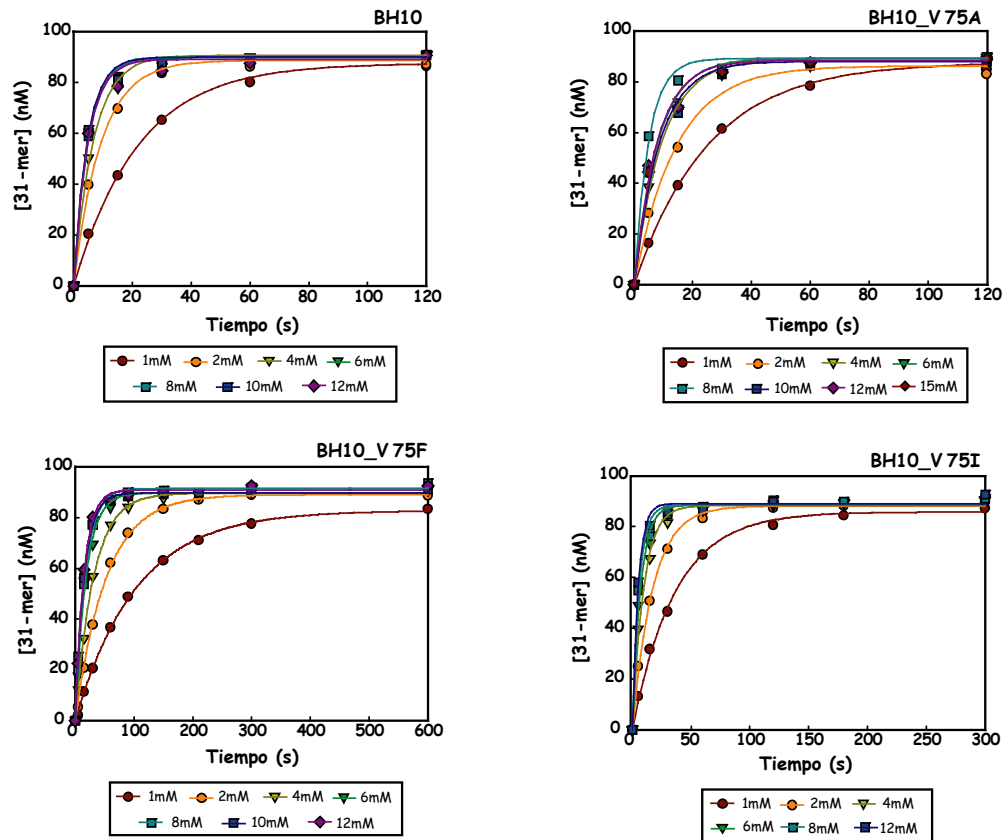
^a $f_{ins} = [k_{pol}(\text{incorrecto})/K_d(\text{incorrecto}) / k_{pol}(\text{correcto})/K_d(\text{correcto})]$, donde los nucleótidos incorrectos fueron dCTP o dGTP, mientras que el nucleótido correcto fue dTTP.

4.3.4.2 Extensión de complejos molde-iniciador con extremos desapareados.

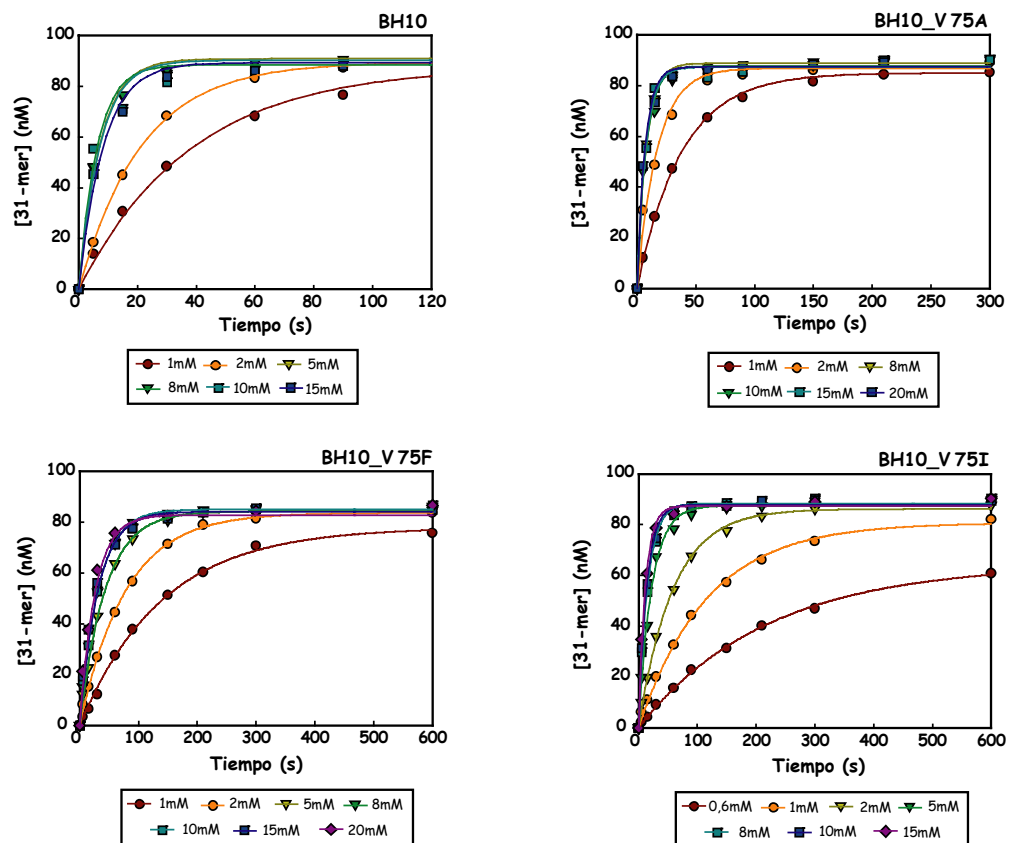
Los parámetros cinéticos obtenidos en la incorporación errónea de nucleótidos sugieren que este paso no contribuye significativamente a las diferencias en la fidelidad entre la RT BH10 y los mutantes en la posición Val-75. Por esta razón, se llevaron a cabo cinéticas de extensión de extremos desapareados en el estado preestacionario.

Se analizó la incorporación de un nucleótido correcto (dTTP) en tres complejos molde-iniciador con el extremo 3' desapareado (G:T, G:G y G:A), usando para ello 31T/21PT, 31T/21PG y 31T/21PA respectivamente. Las constantes de velocidad (k_{obs}) se determinaron bajo condiciones de "single turnover", usando un exceso de enzima (120 nM) sobre sustrato (31/21-mer, 100 nM) y midiendo la cantidad de producto formado a distintas concentraciones de dTTP (Figura 36).

A



B



C

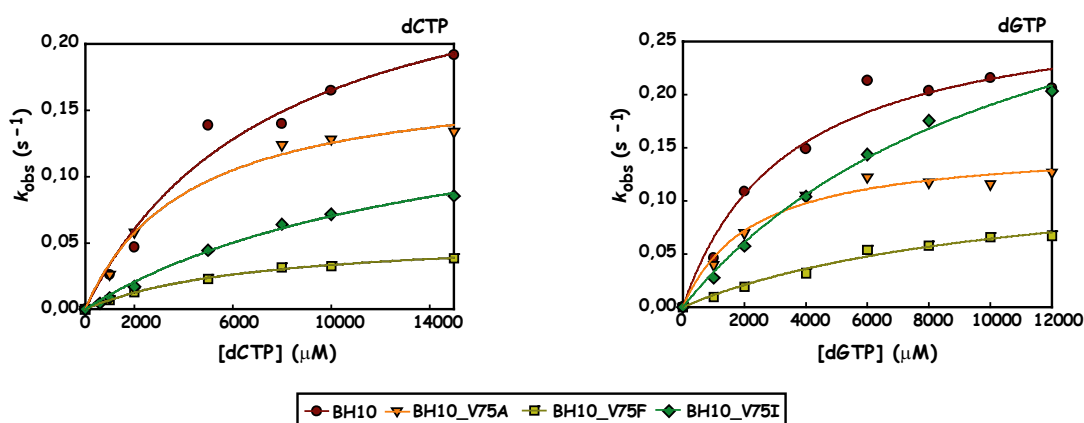


Figura 35. Cálculo de parámetros cinéticos para los nucleótidos incorrectos en el estado preestacionario. Se representan las cinéticas de incorporación de los nucleótidos incorrectos dCTP (A) y dGTP (B) sobre un complejo 31T/21P en estado preestacionario. A una mezcla preincubada de la RT (120 nM) y [5⁻³²P]31T/21P (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes del nucleótido correspondiente en un tampón que contenía 12 mM de Mg²⁺ para las RTs BH10 y BH10_V75A o 18 mM Mg²⁺ para las RTs BH10_V75F y BH10_V75I. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron mediante geles de poliacrilamida. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación: $[P] = A \times [1 - \exp(-k_{obs} \times t)]$, descrita en Materiales y Métodos. (C) Dependencia con la concentración de la incorporación de dCTP (izquierda) o dGTP (derecha) en un complejo 31T/21P por la RT BH10 y los mutantes analizados. Las velocidades de primer orden (k_{obs}) obtenidas de los ajustes del panel A y B se representaron frente a la concentración de nucleótido incorrecto correspondiente. Los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica: $k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP]/(K_d + [dNTP])$, descrita en Materiales y Métodos. Así se obtuvieron los parámetros cinéticos k_{pol} y K_d . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a esta ecuación hiperbólica.

La representación de la k_{obs} frente a la concentración de dTTP, se ajustó a una hipérbola (Figura 37). Así se obtuvieron los parámetros cinéticos (k_{pol} , K_d) para la RT BH10 y los tres mutantes estudiados. Estos parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 11. Como era de esperar, todas las RTs presentaron mayor eficiencia de extensión para el extremo G:T que para los extremos G:G y G:A.

Las diferencias en las eficiencias de extensión de extremos desapareados entre la RT BH10 y el mutante BH10_V75A fueron relativamente pequeñas. Sin embargo, BH10_V75F y BH10_V75I mostraron eficiencias de extensión reducidas. En el caso de BH10_V75I, la reducción de las eficiencias de extensión se dio en los tres extremos desapareados analizados. Por ejemplo, la reducción de la f_{ext} en ensayos en los que iniciadores presentaban extremos desapareados G:T y G:G fue de 3,2 y 5,2 veces respectivamente, debido a un gran aumento en el valor de la K_d (Tabla 11). Para el mutante BH10_V75F, las diferencias con la RT BH10 fueron relativamente pequeñas, excepto para la extensión del extremo G:G, cuya f_{ext} se redujo en 5,4 veces debido tanto a un aumento de la K_d como a una baja velocidad de incorporación (k_{pol}).

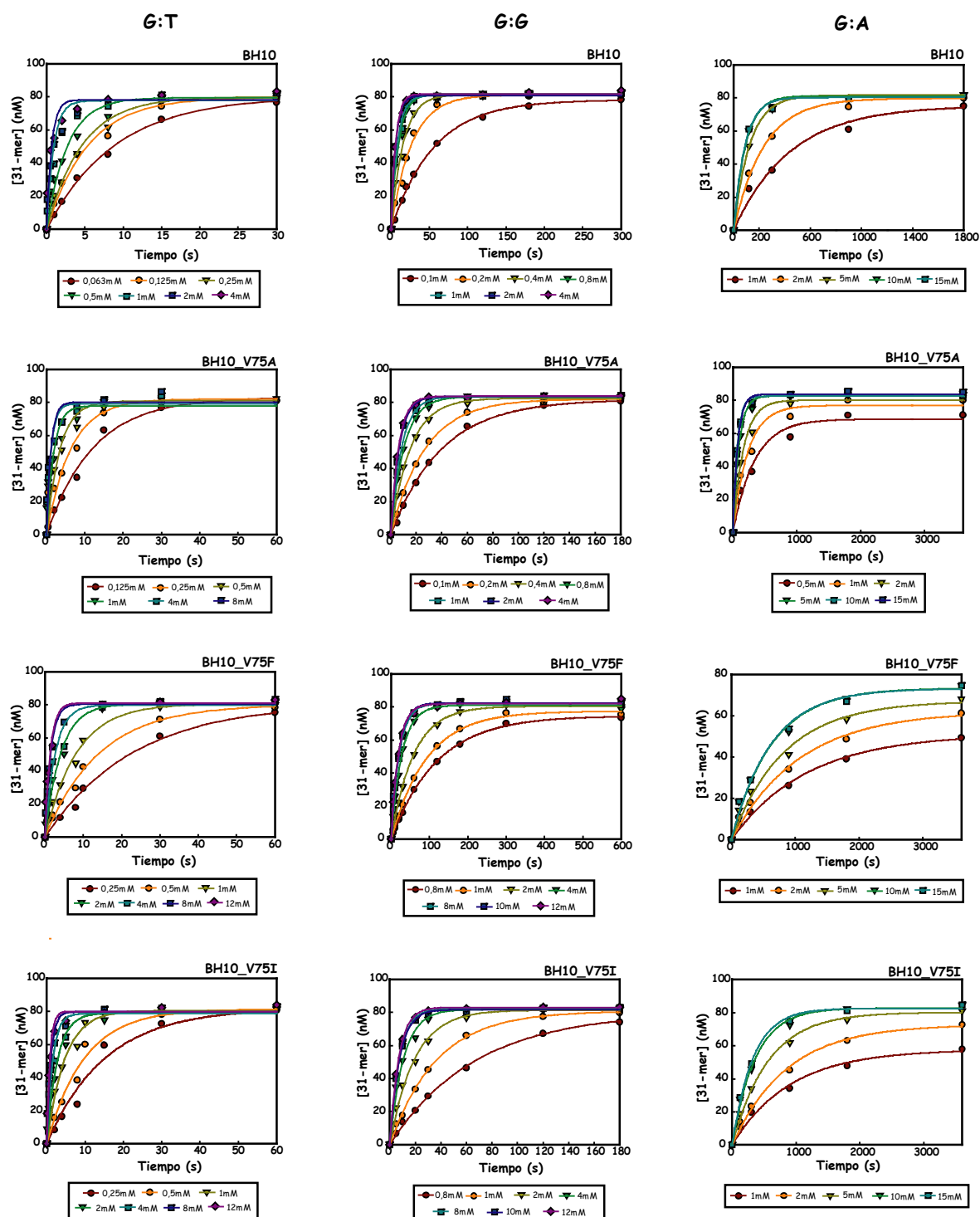


Figura 36. Cinéticas de incorporación en el estado pre-estacionario de dTTP (nucleótido correcto) sobre un complejo 31T/21P con su extremo 3' desapareado. Los extremos desapareados analizados fueron G:T (izquierda), G:G (centro) y G:A (derecha). A una mezcla preincubada de la RT (120 nM) y $[5^{32}\text{P}]31\text{T}/21\text{P}$ (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes del nucleótido en un tampón que contenía 12 mM de Mg^{2+} para las RTs BH10 y BH10_V75A o 18 mM Mg^{2+} para las RTs BH10_V75F y BH10_V75I. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron mediante geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación $[P] = A \times [1 - \exp(-k_{\text{obs}} \times t)]$, descrita en Materiales y Métodos.

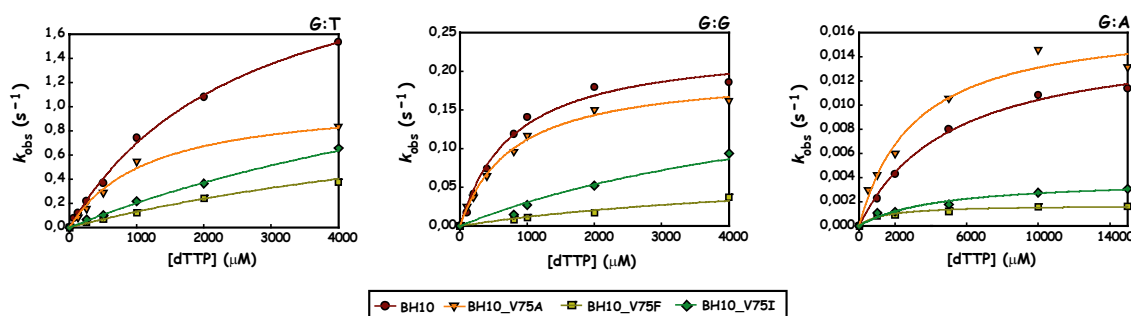


Figura 37. Cálculo de parámetros cinéticos para la extensión de extremos desapareados en el estado preestacionario. Las velocidades de primer orden (k_{obs}) obtenidas de los ajustes de la Figura 36 se representaron frente a la concentración de dTTP para los extremos desapareados G:T (izquierda), G:G (centro) y G:A (derecha). Los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica: $k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP])$, descrita en Materiales y Métodos. Así se obtuvieron los parámetros cinéticos k_{pol} y K_d . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a esta ecuación hiperbólica.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados para la RT BH10 y los mutantes de la posición 75, determinados en el estado pre-estacionario.

Enzima	Par de bases en posición 3 ^a	k_{pol} (s ⁻¹)	K_d (μM)	k_{pol}/K_d (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Frecuencia de extensión de extremos desapareados f_{ext}^b
BH10	G:C	11,57 ± 0,49	13,40 ± 1,88	0,863 ± 0,126	
	G:T	2,54 ± 0,13	2628 ± 252	(9,66 ± 1,05)×10 ⁻³	1,12×10 ⁻³
	G:G	0,2661 ± 0,0199	1014 ± 188	(2,62 ± 0,52)×10 ⁻⁴	3,05×10 ⁻⁴
	G:A	0,0158 ± 0,0009	5110 ± 755	(3,09 ± 0,49)×10 ⁻⁶	3,59×10 ⁻⁶
BH10_V75A	G:C	15,23 ± 1,45	16,30 ± 4,96	0,934 ± 0,298	
	G:T	1,07 ± 0,05	1199 ± 169	(8,93 ± 1,32)×10 ⁻⁴	9,56×10 ⁻⁴
	G:G	0,2130 ± 0,089	853 ± 94	(2,50 ± 1,08)×10 ⁻⁴	2,69×10 ⁻⁴
	G:A	0,01715 ± 0,0015	3086 ± 832	(5,56 ± 1,57)×10 ⁻⁶	5,98×10 ⁻⁶
BH10_V75F	G:C	8,36 ± 0,65	33,25 ± 6,91	0,251 ± 0,056	
	G:T	1,31 ± 0,14	9076 ± 1795	(1,45 ± 0,32)×10 ⁻⁴	5,78×10 ⁻⁴
	G:G	0,0839 ± 0,0093	5892 ± 1459	(1,42 ± 0,39)×10 ⁻⁵	5,65×10 ⁻⁵
	G:A	0,0017 ± 0,0002	1372 ± 514	(1,24 ± 0,49)×10 ⁻⁶	4,94×10 ⁻⁶
BH10_V75I	G:C	7,86 ± 0,88	12,07 ± 4,64	0,651 ± 0,261	
	G:T	2,15 ± 0,39	9539 ± 1571	(2,26 ± 0,42)×10 ⁻⁴	3,47×10 ⁻⁴
	G:G	0,2242 ± 0,0265	5888 ± 1533	(3,81 ± 1,09)×10 ⁻⁵	5,86×10 ⁻⁵
	G:A	0,0036 ± 0,0006	3987 ± 1632	(0,903 ± 0,399)×10 ⁻⁶	1,39×10 ⁻⁶

Se usó el complejo 31T/21P como sustrato. Las condiciones experimentales utilizadas se han descrito en las Figuras 36 y 37. Los datos se muestran como el valor ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó al menos dos veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue menor del 20%.

^a La primera base corresponde al molde y la segunda al iniciador.

^b $f_{ext} = [k_{pol}(\text{apareado})/K_d(\text{desapareado}) / k_{pol}(\text{apareado})/K_d(\text{desapareado})]$

4.3.5 Fidelidad de copia de DNA analizada mediante ensayos genéticos

Para confirmar los resultados obtenidos mediante los ensayos bioquímicos y además calcular la tasa global de mutación de las RTs con sustituciones de aminoácido en la posición 75, se usó un ensayo genético basado en la introducción de mutaciones por la RT usando como molde el DNA del fago M13mp2 y el gen *lacZ* como gen marcador. Las mutaciones generadas cuando la RT copia la región del gen *lacZ*, eliminada del DNA del M13mp2, pueden ser determinadas al detectarse como placas de lisis con fenotipo de color azul claro o incoloro.

La frecuencia de mutantes se calculó como la relación entre el número de placas mutantes y el número de placas totales. Los resultados mostrados en la [Tabla 12](#) revelan que la frecuencia de mutantes obtenida con la RT BH10 fue 1,4 veces menor que la obtenida con la enzima BH10_V75A. Por el contrario, las RTs BH10_V75F y BH10_V75I fueron 1,8 y 3,0 veces más fieles que la enzima BH10. Estos resultados son consistentes con lo observado en los estudios cinéticos.

Tabla 12. Fidelidad de la RT BH10 y de los mutantes con los cambios V75A, V75F y V75I medida mediante ensayos genéticos

Enzima	Placas totales	Placas mutantes	Frecuencia de mutantes ($\times 10^{-4}$)	Incremento de la fidelidad
M13mp2 <i>lacZ</i> "Forward Mutation Assay" ^a				
BH10	6736	139	206	-
BH10_V75A	5271	148	281	0,7
BH10_V75F	6157	69	112	1,8
BH10_V75I	6033	42	69,6	3,0
M13mp2 <i>lacZ</i> "Reversion Mutation Assay"				
BH10	1292640	35	27	-
BH10_V75I	4059250	32	7,8	3,5

^a Como control se secuenció el fragmento de 361 pares de bases correspondiente al gen *lacZ* del DNA de M13mp2 aislado de cinco placas mutantes para cada reacción de síntesis. Todas las placas mutantes analizadas contenían mutaciones sencillas dentro del gen *lacZ* que condujeron a la inactivación de éste. La frecuencia de mutantes estimada como fondo fue de 5×10^{-4} .

La mayor fidelidad conferida por el cambio V75I fue confirmada usando una variante de este ensayo genético, denominado ensayo de reversión. En este ensayo, el DNA del fago M13mp2, que sirve como sustrato de la reacción de síntesis, contiene un codón de terminación “amber” (TGA) en el gen *lacZ* que inactiva la actividad de α -complementación produciendo un fenotipo de placa mutante (blanca). Los errores introducidos por la polimerasa pueden restaurar esta actividad dando lugar a placas de fenotipo azul. La frecuencia de mutantes obtenida para la RT BH10 fue 3,5 veces mayor que la obtenida para la RT BH10_V75I (Tabla 12). Este resultado está de acuerdo con el obtenido mediante el ensayo de introducción de mutaciones para el mutante BH10_V75I. Así, podemos decir que el cambio V75I produce un aumento de la fidelidad de al menos 3 veces en ensayos genéticos.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1 Determinantes moleculares de la resistencia a NRTIs en RTs portadoras de inserciones en el subdominio “fingers”

A pesar de los éxitos conseguidos con las terapias antirretrovirales, el desarrollo de resistencias continúa siendo la causa principal del fracaso de los tratamientos contra la infección por el VIH-1. El aumento en la complejidad de los regímenes terapéuticos y el incremento en el número de NRTIs disponibles para estos tratamientos, ha llevado a la aparición de aislados virales con mutaciones de resistencia poco comunes. Así, en 1997, [De Antoni et al.](#) identificaron una inserción de dos aminoácidos entre los residuos 69 y 70 de la RT, en aislados virales que provenían de un paciente en el que fracasó la terapia con ddl e hidroxiurea ([De Antoni et al., 1997](#)). La inserción (Ser-Ser) se detectó después de sólo 12 semanas de terapia y fue causada, aparentemente, por una duplicación de seis nucleótidos en el genoma viral, después de que se produjera una mutación C→G en la segunda base del codón 69. Tras 24 semanas de tratamiento, la secuencia insertada (AGTAGT) cambió a AGTGGT (Ser-Gly). Hasta la actualidad se han descrito un gran número de aislados virales del VIH-1 que presentan inserciones de dos aminoácidos entre los codones 69 y 70, en combinación con mutaciones de resistencia a NRTIs (incluyendo TAMs). En ensayos fenotípicos, estos aislados virales exhiben niveles elevados de resistencia a AZT y niveles bajos a moderados de resistencia a otros NRTIs. Se ha estimado que el 0,5%-2,7% de los pacientes en los que fracasa la terapia antirretroviral presentan una inserción de dos aminoácidos entre los codones 69 y 70 de la RT del VIH-1 ([Tamalet et al., 1998](#); [Ballota et al., 2000](#); [Van Vaerenbergh et al., 2000](#); [Masquelier et al., 2001](#); [Schneider et al., 2004](#)).

Se ha observado una buena correlación entre los resultados de ensayos fenotípicos y la actividad fosforolítica dependiente de ATP que presentan las enzimas recombinantes portadoras de inserciones en el subdominio “fingers”. Esta actividad es muy alta cuando el análisis se realiza sobre iniciadores bloqueados con AZTMP y significativa cuando se usan iniciadores bloqueados con d4TMP. Por el contrario, la actividad fosforolítica dependiente de ATP es baja cuando se utilizan iniciadores bloqueados con otros NRTIs, como por ejemplo análogos a citidina ([Mas et al., 2002](#)).

La RT SS usada en esta Tesis es un prototipo de este tipo de enzimas multirresistentes. Además del cambio T69S y la inserción de dos serinas, contiene una serie de mutaciones asociadas a resistencia, como M41L, A62V, K70R, V108I, V118I, Y181C, M184I, L210W y T215Y. Los virus recombinantes que son portadores de la enzima SS son resistentes a AZT y d4T en ensayos fenotípicos (Tabla 13) (Mas *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2004). En ensayos llevados a cabo en nuestro laboratorio se demostró que la inserción por sí misma no tiene un gran impacto en la resistencia a AZT pero contribuye a ésta cuando se encuentra acompañada de TAMs y otras mutaciones de resistencia (Mas *et al.*, 2000).

5.1.1 Influencia de la Tyr-215 en la actividad fosforolítica de la RT SS

El cambio T215Y es el que aparece asociado con mayor frecuencia con las inserciones de dos aminoácidos (Figura 18). La enzima mutante BH10_SSSY, que contiene la inserción junto con la mutación T215Y, en el contexto de secuencia de la enzima BH10, presentó niveles de actividad fosforolítica dependiente de ATP sensiblemente más altos que los presentados por la enzima BH10, cuando se emplearon como sustratos iniciadores bloqueados con AZTMP y d4TMP. Sin embargo, la capacidad de escisión de dicha enzima no fue tan alta como la de la RT SS, que presenta además otras TAMs como M41L, K70R o L210W. Estos datos son consistentes con los obtenidos en ensayos fenotípicos con los clones del VIH-1 recombinantes portadores de las correspondientes RTs (Tabla 13) (Larder *et al.*, 1999; Lennerstrand *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2004).

Aunque la presencia de la inserción Ser-Ser junto con un aminoácido aromático en la posición 215 sea suficiente para conferir algo de resistencia, está claro que son necesarios más cambios para conseguir los niveles elevados de resistencia que presenta la RT SS. Trabajos anteriores demostraron que la mutación T215Y por sí sola produce un incremento muy pequeño (<3 veces) de la actividad fosforolítica dependiente de ATP sobre iniciadores bloqueados con AZTMP (Naeger *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002). Por lo tanto, para resolver la cuestión de si la Tyr-215 es necesaria para mantener la actividad fosforolítica dependiente de ATP sobre iniciadores bloqueados con análogos de timidina, se sustituyó ésta por Thr, Ser y Asn, en la RT SS. En presencia de ATP, las enzimas mutantes obtenidas no fueron capaces de escindir, ni el AZTMP, ni el d4TMP de iniciadores bloqueados con el inhibidor. Estos

resultados están de acuerdo con los obtenidos en ensayos donde los virus mutantes correspondientes resultaron ser susceptibles a la inhibición por análogos de timidina (Tabla 13) (Prado *et al.*, 2004).

Tabla 13. Susceptibilidad a NRTIs de variantes recombinantes del VIH-1, portadoras de cambios en la RT.

Enzimas	CI ₅₀ (μM)			
	AZT	d4T	ddC	3TC
BH10	6,6 x 10 ⁻³	0,24	0,23	0,56
BH10_T69SSS	2,2 x 10 ⁻³ (0,3)	0,54 (2,2)	0,14 (0,6)	1,84 (3,3)
BH10_SSSY	0,043 (6,5)	2,09 (8,7)	1,56 (6,8)	4,6 (8,2)
SS	5,17 (786)	2,23 (9,1)	1,10 (4,7)	>20 (>35)
SS_2S0S	0,94 (143)	5,94 (24,2)	2,86 (12,2)	>20 (>35)
SS_D67N	3,54 (536)	2,62 (10,9)	2,65 (11,5)	>20 (>35)
SS_Y215T	6,6 x 10 ⁻³ (1)	0,49 (2,1)	2,41 (10,5)	>20 (>35)
SS_Y215S	0,019 (2,9)	0,32 (1,3)	1,49 (6,5)	>20 (>35)
SS_Y215N	5,8 x 10 ⁻³ (0,9)	0,29 (1,2)	1,29 (5,6)	>20 (>35)

^a Los valores de CI₅₀ representan la media de 2-5 experimentos, cada uno realizado por sextuplicado. Entre paréntesis se muestra el incremento de CI₅₀ de cada RT relativo a la CI₅₀ del virus WT HXB2, que contiene la RT BH10. Estos datos se han tomado de Matamoros *et al.* (2004) y fueron obtenidos en los laboratorios de los Dres. Miguel Ángel Martínez y Javier Martínez-Picado (Fundación IrsiCaixa).

Cuando se midió la actividad fosforolítica en presencia de PPi 200 μM utilizando como sustratos iniciadores terminados con AZTMP, no se observaron diferencias significativas entre la enzima BH10, la enzima multirresistente SS, y los mutantes con cambios en la posición 215 (SS_Y215T, SS_Y215N y SS_Y215S). Estos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores donde se observó que las diferencias en los niveles de actividad fosforolítica entre las RTs resistentes a AZT y la RT WT eran relativamente pequeñas (Arion *et al.*, 1998) o no significativas (Carroll *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1999). La concentración de PPi se eligió basándose en estimaciones previas de la concentración intracelular de PPi en linfocitos no estimulados (Barshop *et al.*, 1991).

Recientemente, se ha estimado que la concentración intracelular de PPi en células T CD4⁺ altamente estimuladas se encuentra en un rango entre 55 y 79 μM. Sin embargo, en células T CD4⁺ no estimuladas, en macrófagos y en células T CD8⁺, los niveles de PPi estarían 10 veces por debajo de este rango (Smith *et al.*, 2005). Se ha observado que la escisión de AZTMP es muy poco eficiente para la enzima WT, cuando la concentración de PPi se encuentra en los niveles estimados para macrófagos y células T CD4⁺ no estimuladas. Sin embargo, aumenta

considerablemente cuando la concentración de PPi está por encima de 80 μ M (Smith y Scott, 2006). Por tanto, diferencias relevantes entre RTs resistentes a AZT y la RT WT solo han sido detectadas en presencia de concentraciones muy bajas de PPi.

A diferencia de lo que ocurre con iniciadores bloqueados con AZTMP, los mutantes con cambios en la posición 215 presentaron una actividad fosforolítica dependiente de PPi más baja que la RT SS, cuando se utilizaron como sustrato iniciadores bloqueados con d4TMP.

Existen evidencias que sugieren que el ATP es el principal donador de PPi *in vivo* (Meyer *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002) y aunque la relevancia fisiológica del PPi no está clara, todos estos datos apuntan a que las mutaciones en la posición 215 tienen un efecto sobre el alineamiento óptimo del iniciador bloqueado con respecto al donador de PPi.

5.1.2 Los dNTPs son capaces de inhibir la reacción de escisión responsable de la resistencia a inhibidores de la RT análogos a timidina

Bajo condiciones fisiológicas, la eficiencia del rescate de análogos a timidina, depende de la velocidad de la reacción, pero también del contexto de secuencia del complejo molde-iniciador (Meyer *et al.*, 2004, 2007) y de la capacidad de los dNTPs para inhibirla (Tong *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999). La RT unida a un complejo molde-iniciador bloqueado y a un dNTP complementario al siguiente nucleótido de la hebra del molde, forman un complejo inactivo ("dead end complex"). Se dispone de una estructura cristalográfica de un complejo ternario formado por la RT, un iniciador de DNA bloqueado con dideoxiguanosina hibridado con un molde de DNA y dTTP (Huang *et al.*, 1998) (Figura 37). En estas condiciones la reacción de escisión se encuentra bloqueada y la estructura sería la esperada para un "dead end complex".

Las concentraciones de dNTP requeridas para inhibir las reacciones de escisión de inhibidores análogos a nucleósido han sido determinadas para un gran número de RTs que presentan actividad fosforolítica dependiente de ATP (D67N/K70R/T215Y/K219Q, M41L/T215Y, M41L/T69SSS/T215Y, etc...) (Meyer *et al.*, 1999, 2000, 2003a; Mas *et al.*, 2002). Mientras que las concentraciones necesarias para inhibir el rescate de AZTMP fueron bastante altas, con CI_{50} s de 40 a $>250 \mu$ M, los valores de CI_{50} obtenidos para iniciadores bloqueados con d4TMP, ddTMP y ddAMP

fueron, normalmente, inferiores a 25 μM . Nuestros resultados están de acuerdo con estos datos. Así, se necesitaron concentraciones de dNTP más de 20 veces superiores para inhibir las reacciones de escisión de AZTMP que para inhibir las de d4TMP. Estas diferencias han sido atribuidas a la presencia de un sustituyente voluminoso en la posición 3' de la ribosa en los iniciadores terminados con AZTMP, lo que crearía un impedimento estérico en el sitio de unión del dNTP (denominado sitio N), que reduciría la accesibilidad de los dNTPs (Sarafianos *et al.*, 2002).

Bajo nuestras condiciones de ensayo, ninguna de las mutaciones probadas produce un efecto significativo en los valores de CI_{50} para la escisión de AZTMP y d4TMP. Además, la presencia de ATP o PPi no tiene ningún efecto en la inhibición por el siguiente dNTP complementario. Sin embargo, cuando estudiamos la formación de complejos ternarios mediante ensayos de retardo en gel, se observaron diferencias importantes en la K_d aparente para la unión del dNTP, entre las enzimas utilizadas. La RT SS fue alrededor de 6 veces más resistente a la inhibición por dNTP que la enzima BH10. Además, la Tyr-215 era parcialmente responsable de las diferencias observadas, ya que las RTs que presentaban Ser o Thr en esta posición eran algo más sensibles a la inhibición por el siguiente dNTP complementario. Una posible explicación para las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos mediante los dos tipos de ensayos utilizados (inhibición de la reacción de escisión y formación de complejos ternarios estables), se relacionaría con la presencia del donador de PPi .

Usando un exceso de foscarnet (un análogo de PPi) en la formación de los complejos ternarios RT-DNA/ DNA^{d4T} -dNTP, todas las RTs estudiadas presentaron una susceptibilidad similar a la inhibición por el siguiente dNTP complementario. Los valores de la $K_{d[\text{dNTP}]}$ aparente fueron similares a los de las CI_{50} obtenidas para la inhibición de las reacciones de escisión. En trabajos recientes se ha determinado, mediante técnicas de "footprinting", que el foscarnet estabiliza el complejo en el estado pre-translocacional (Marchand *et al.*, 2007a; Meyer *et al.*, 2007), lo que prevendría la unión del siguiente dNTP. Así, el foscarnet se comportaría como un inhibidor competitivo. Sin embargo, en nuestras condiciones de ensayo no se observó la formación de complejos ternarios estables RT-DNA/ DNA^{d4T} -foscarnet, lo cual está de acuerdo con lo observado por Cruchaga *et al.*, quienes observaron que la unión del foscarnet al complejo binario (RT-DNA/DNA) se encuentra entorpecida por la presencia de un terminador de cadena (AZT) en el extremo 3' del iniciador (Cruchaga *et al.*, 2006).

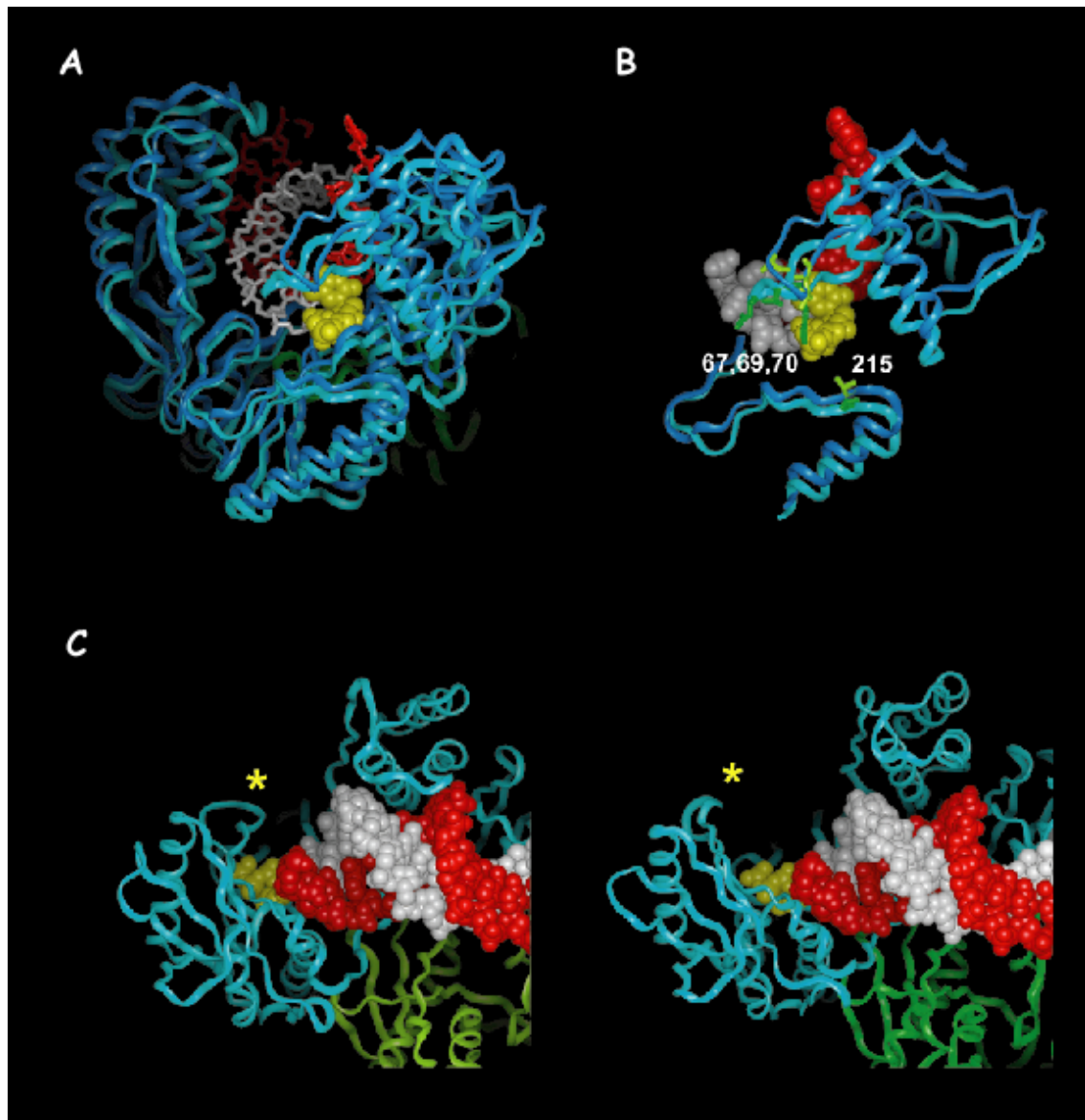


Figura 37. Análisis estructural de los complejos binario y ternario de la RT del VIH-1, que muestran cambios conformacionales en la horquilla $\beta 3\text{-}\beta 4$ y localización del residuo 215. **(A)** Superposición de los esqueletos de carbono α de la RT que se encuentra formando un complejo binario RT-DNA/DNA (azul oscuro) y un complejo ternario RT-DNA/DNA-dTTP (azul claro). Las cadenas del molde (rojo) y del iniciador (blanco) representadas son las correspondientes al complejo ternario. El dTTP entrante se muestra en amarillo. **(B)** Visión detallada de la localización de Asp-67, Thr-69, y Lys-70 en la horquilla $\beta 3\text{-}\beta 4$ y de Thr-215 en la hebra $\beta 11a$, para mostrar los cambios conformacionales implicados en la formación del complejo ternario. **(C)** Muestra una visión lateral del complejo ternario (izquierda) y binario (derecha) mostrando los cambios conformacionales que ocurren en el extremo de la horquilla $\beta 3\text{-}\beta 4$ (asterisco amarillo). Las subunidades de 66 y 51 kDa se representan en azul y verde respectivamente.

Las coordenadas han sido obtenidas del Protein Data Bank códigos 1RTD (Huang *et al.*, 1998) y 3HMI (Ding *et al.*, 1998). Los modelos se han preparado usando el programa Insight II (Accelrys Inc.).

Estos resultados sugieren que a pesar de estar fuera del sitio de unión del dNTP y lejos del bolsillo catalítico, la Tyr-215 ejerce una influencia significativa en la conformación del sitio de unión del dNTP. Este efecto podría ser contrarrestado por la presencia de un donador de PPI.

5.1.3 Localización estructural de la Tyr-215 y de la inserción Ser-Ser en la RT del VIH-1: Implicaciones en resistencia

Estudios de modelado molecular han llevado a algunos autores a proponer que la Tyr-215 podría participar en la unión del ATP, facilitando así la escisión de análogos a nucleósido de iniciadores bloqueados cuando el extremo 3' del iniciador se encuentra en el sitio N (Boyer *et al.*, 2001; Sarafianos *et al.*, 2002). La Tyr-215 está expuesta hacia el exterior en las estructuras cristalográficas de las RTs que tienen la mutación T215Y (y otras TAMs) (Ren *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 2002) (Figura 37B). Este residuo podría participar directamente en la unión a la base de la adenina del ATP mediante interacciones de Van der Waals. Sin embargo, de acuerdo con este modelo, el ATP no podría contactar simultáneamente con las cadenas laterales mutadas de los residuos 41 y 215. Los datos bioquímicos disponibles tampoco son consistentes con la hipótesis de que el ATP se una con mayor afinidad a las RTs resistentes a AZT (Ray *et al.*, 2003).

Todas las estructuras cristalográficas de RTs resistentes a AZT son complejos de la RT unida a un inhibidor no análogo a nucleósido y muestran una conformación, en la que la distancia entre los subdominios “fingers” y “thumb” es incluso mayor que en la conformación “abierta” del complejo binario (Ren *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 2002). Por esto, no se puede excluir la posibilidad de que la aparición de una Tyr en la posición 215 implique cambios conformacionales durante la polimerización, que podrían explicar sus efectos sobre la reacción de escisión.

Otro factor que añade complejidad al estudio del mecanismo de escisión mediado por ATP es que la reacción de rescate requiere concentraciones milimolares de ATP, las cuales son suficientemente altas para competir con los dNTPs por unirse al sitio N (Cases-González *et al.*, 2000).

Las estructuras cristalográficas disponibles para los complejos binario y ternario de la RT WT muestran cambios conformacionales significativos que implican un movimiento de la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ en la que se encuentra la inserción en la RT SS. En la conformación “cerrada” del complejo ternario (Figura 37C), la cadena lateral de la Lys-65 interacciona directamente con el fosfato γ del dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998), mientras que en el complejo binario, este residuo se encuentra en el extremo del subdominio “fingers”, lejos del sitio de unión del dNTP (Ding *et al.*, 1998). Sin embargo, los cambios conformacionales que afectan a la hebra $\beta 11a$ que contiene la Thr-215 son menos importantes. Los datos obtenidos en esta Tesis sugieren que en condiciones fisiológicas (por ejemplo, altas concentraciones de ATP), el mecanismo de resistencia es dependiente del donador de PPI, cuya interacción parece estar muy afectada por la cadena lateral de la Tyr-215 y en menor medida por la conformación de la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$.

5.1.4 Patrones de mutaciones encontradas *in vivo* y su correlación con los datos bioquímicos

Estudios previos han demostrado que la interrupción de la terapia con análogos a nucleósido conduce a la sustitución de virus multirresistentes por cepas WT (Lukashov *et al.*, 2001; Briones *et al.*, 2000). Reemplazar una Tyr por una Thr implica dos cambios de nucleótido. Sin embargo, una mutación (p. ej. Y215N o Y215S) podría ser suficiente para eliminar la resistencia a análogos de timidina, facilitando un camino alternativo de sensibilización. Estas reversiones no se han descrito en pacientes infectados con cepas de RTs que contienen la inserción, pero son relativamente comunes en aislados de pacientes que presentan las mutaciones clásicas de resistencia a AZT (Goudsmit *et al.*, 1997; Yerly *et al.*, 1998), en los que los cambios de aminoácido T215D, T215C y T215S aparecen cuando se retira el tratamiento antirretroviral (De Ronde *et al.*, 2001; García-Lerma *et al.*, 2001).

La mutación D67N es muy rara en RTs que contienen inserciones. Estudios de dinámica de poblaciones virales han demostrado que en algunos aislados esta mutación se detecta muy pronto junto con T215Y y la inserción, pero es rápidamente reemplazada por D67S, sugiriendo que D67N confiere una pérdida de “fitness” al virus multirresistente. Nuestros estudios bioquímicos no revelan ninguna diferencia significativa entre la RT SS y el mutante SS_D67N. Además, en los laboratorios de los Dres. Miguel Ángel Martínez y Javier Martínez-Picado (Fundación irsiCaixa) se

observó que los virus recombinantes que contenían estas enzimas eran viables y replicaban eficientemente en células SupT1 (Prado *et al.*, 2004). Es más, la introducción de la mutación D67N en la RT multirresistente SS no afectó al “fitness” de la enzima (Tabla 13) (Prado *et al.*, 2004).

En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó que además de la inserción y de la presencia de Tyr-215 existen otros cambios de aminoácido, tales como M41L, A62V, y en menor medida K70R, que contribuyen a un incremento en la capacidad de escisión de AZTMP y d4TMP, en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP. Esta capacidad de escisión fue consistente con las medidas de susceptibilidad a AZT y con la resistencia fenotípica a d4T (Cases-González *et al.*, 2007).

Trabajos recientes apoyan la existencia de dos patrones mutacionales distintos que confieren resistencia a AZT, basados en la distribución de las mutaciones de resistencia a análogos de timidina en pacientes tratados con NRTIs. El primer patrón (designado como TAM-1) implica la asociación de M41L, L210W y T215Y, excluyendo a K70R. El segundo (TAM-2) incluye las mutaciones D67N, K70R y K219E/Q y a veces T215F (Yahi *et al.*, 1999; Hanna *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2006; Svicher *et al.*, 2006). Estudios de susceptibilidad a fármacos y datos clínicos obtenidos de pacientes infectados por virus que presentan los distintos patrones mutacionales han revelado que la combinación TAM-1 es responsable de un mayor número de resistencias cruzadas a fármacos antirretrovirales, mientras que confiere elevados niveles de resistencia a AZT. La inserción de dos aminoácidos en el subdominio “fingers” de la RT está asociado normalmente con este patrón TAM-1, en pacientes en los que ha fracasado la terapia antirretroviral (Marcelin *et al.*, 2004).

Por tanto, la identificación de M41L y T215Y como mutaciones claves asociadas con la inserción, junto con el hecho de que D67N se encuentra raramente en RTs que presentan inserciones en la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$, apoya la correlación observada entre el patrón TAM-1 y la presencia de inserciones en RTs resistentes a múltiples NRTIs.

5.2 Búsqueda de nuevas estrategias para la inhibición de la reacción de escisión, responsable de la resistencia a inhibidores de la RT análogos a timidina en cepas multirresistentes del VIH-1

5.2.1 Efecto de las modificaciones en los fosfatos del donador de PPI sobre la reacción de escisión

Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, la resistencia a AZT y d4T que muestra la enzima SS viene dada por su elevada actividad fosforolítica dependiente de ATP (Mas *et al.*, 2000, 2002). La reacción de escisión conduce a la formación de un dinucleótido polifosfato (Meyer *et al.*, 1998). Esta reacción no implica la hidrólisis del enlace β,γ -fosfodiéster, ya que análogos de ATP no hidrolizables como α,β -metilen-ATP, β,γ -metilen-ATP (Meyer *et al.*, 1998) o AppNHp (Resultados, Figura 28), pueden servir como sustrato para la reacción fosforolítica. Sin embargo, los átomos de oxígeno unidos al fosfato γ del ATP parece que juegan un papel importante en la reacción de escisión. La sustitución de un oxígeno por un azufre, como ocurre en el ATP γ S, implica una reducción de dos veces en la actividad fosforolítica dependiente de ATP de la RT SS.

5.2.2 Introducción de un grupo borano en el fosfato α de NRTIs y su impacto en la actividad fosforolítica de RTs multirresistentes

Recientemente, los nucleósidos que presentan un grupo borano (BH_3) en su fosfato α han levantado un gran interés como un nuevo tipo de inhibidores análogos a nucleósido. La sustitución de un oxígeno del fosfato α por un grupo BH_3 en análogos a nucleósidos trifosfato, introduce quiralidad al fósforo α y conduce a la formación de un α -boranofosfato. Estudios bioquímicos han demostrado que los α -(R_p)-boranofosfatos son fosforilados por la enzima nucleósido difosfato quinasa, más rápidamente que los análogos a nucleósido de los que proceden. Esto convierte a estos compuestos en inhibidores más eficiente para la RT del VIH-1 (Meyer *et al.*, 2000).

Estudios cinéticos en el estado pre-estacionario, llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Bruno Canard, revelaron que tanto la RT BH10 como la SS son capaces de incorporar los dos diastereoisómeros (R_p y S_p) del AZTTP. Sin embargo, se observó una mayor eficiencia catalítica (k_{pol}/K_d) para el diastereoisómero R_p en

comparación con el S_p . Tanto la k_{pol} como la K_d fueron significativamente menores para el diasteroisómero S_p , mostrando diferencias entre 65 y 80 veces respecto al R_p . Se sabe que la presencia del grupo BH_3 en nucleótidos relevantes clínicamente, aumenta el valor de k_{pol} para la incorporación del diasteroisómero R_p sin afectar su unión al centro activo de la RT (Selmi *et al.*, 2001b; Deval *et al.*, 2002). Para los α -boranoderivados de AZTTP, d4TTP, ddTTP y 3TCTP este incremento en la k_{pol} , suprime la resistencia mediada por la sustitución de un aminoácido como K65R, Q151M o M184V, o por múltiples mutaciones (p. ej. A62V/V75I/F77L/F116YQ151M) (Selmi *et al.*, 2001b; Deval *et al.*, 2002, 2005). En el caso de la RT SS se observó un incremento de 3,5 veces en el valor de la k_{pol} para la incorporación de α -(R_p)- BH_3 -AZTTP respecto a AZTTP, mientras que este efecto se redujo a dos veces para la enzima BH10. Sin embargo, las RTs BH10 y SS, mostraron una selectividad de nucleótido similar en cuanto a su capacidad para discriminar entre AZTTP y dTTP, lo que estaba de acuerdo con los resultados obtenidos con anterioridad en el estado estacionario (Mas *et al.*, 2000). En concreto, estos datos demostraron que la introducción del grupo BH_3 en el fosfato α del AZTTP no produce grandes diferencias en la selectividad de nucleótido entre las RTs BH10 y SS.

Los resultados descritos en esta Tesis muestran además que la presencia del grupo BH_3 no tiene un impacto significativo en la actividad fosforolítica dependiente de ATP de la RT SS. Los iniciadores bloqueados tanto con α -(R_p)- BH_3 -AZTMP como con α -(S_p)- BH_3 -AZTMP fueron rescatados eficientemente en presencia de ATP. Curiosamente, la enzima BH10 también mostró actividad fosforolítica dependiente de ATP con iniciadores bloqueados con α -(R_p)- BH_3 -AZTMP o α -(S_p)- BH_3 -AZTMP.

Cuando un nucleósido α -borano es incorporado al DNA, el enlace boranofosfato formado retiene la misma carga que el enlace fosfodiéster, ya que el grupo BH_3 y el oxígeno sustituido son isoelectrónicos. Sin embargo, la electronegatividad y la distribución de la densidad de carga en el enlace varía según esté presente uno u otro. Además, el grupo BH_3 no forma enlaces de hidrógeno clásicos y no coordina metales (Crabtree *et al.*, 1996; Cramer y Gladfelter, 1997; Summers *et al.*, 1998; Summers y Ramsay, 2001).

Estudios de modelado molecular basados en el complejo ternario de la RT con el molde-iniciador y el dTTP (Huang *et al.*, 1998), muestran que la sustitución de un oxígeno en el fosfato α del dNTP entrante por un grupo BH_3 afecta a la coordinación

con el Mg^{2+} implicado en la unión del dNTP entrante (sitio B) (Figura 33), cuando se considera el diastereoisómero S_p . Este Mg^{2+} se coordina con las cadenas laterales de los residuos catalíticos Asp-110 y Asp-185, así como con un átomo de oxígeno del fosfato γ del dNTP. Por el contrario, el diastereoisómero R_p se posiciona hacia fuera de los residuos catalíticos, siendo la Arg-72 el aminoácido más cercano al grupo BH_3 (Figura 38). La Arg-72 forma parte del sitio de unión del dNTP, con su cadena lateral formando puentes de hidrógeno con el nucleótido entrante. Sin embargo, se ha observado que este residuo es prescindible cuando el grupo BH_3 está presente (Deval *et al.*, 2005).

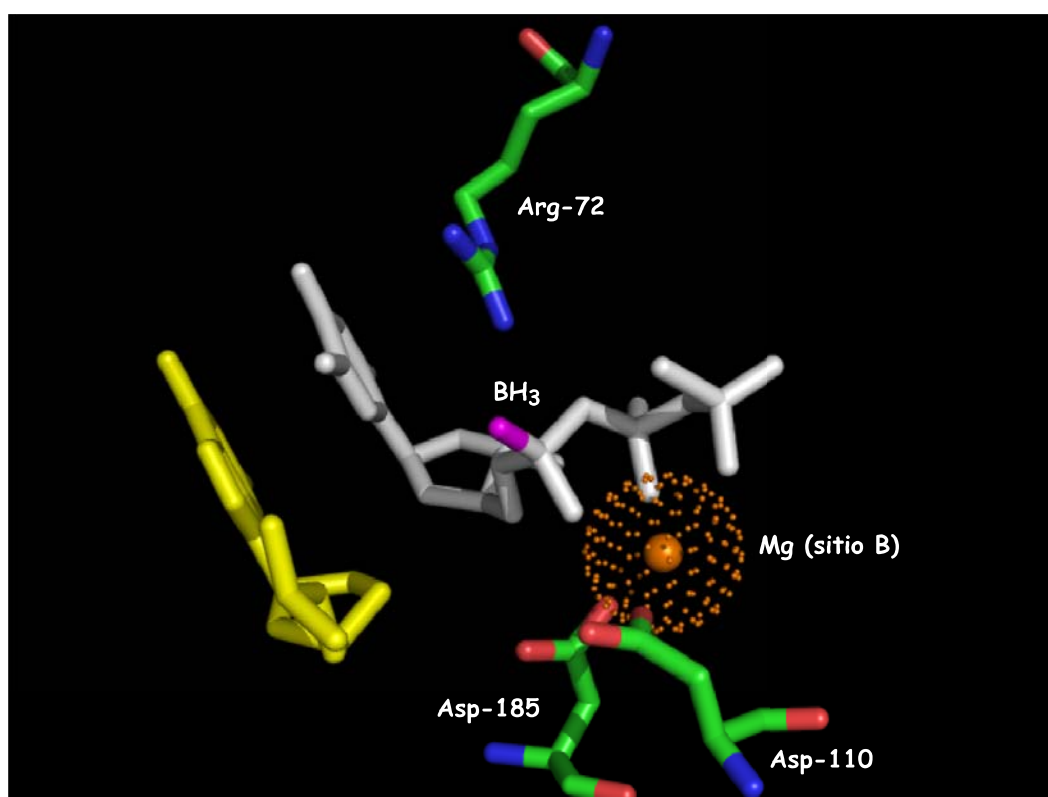


Figura 38. Modelo que muestra la localización del α -(R_p)- BH_3 -dTTP (blanco) en el complejo ternario RT-DNA/DNA-dTTP del VIH-1 (PDB 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). En morado se representa el grupo borano (BH_3) en su conformación R_p . En amarillo se muestra la posición +1 del iniciador. Esta figura se ha realizado con el programa "PyMOL Molecular Graphics System" (DeLano Scientific).

Se ha propuesto un modelo, basado en datos estructurales, para explicar el mecanismo molecular implicado en la actividad fosforolítica dependiente de ATP (Boyer *et al.*, 2001). De acuerdo con este modelo, en un complejo formado por la RT y DNA, el extremo 3' bloqueado del iniciador puede ocupar una de estas dos posiciones: el sitio P ("priming site") o el sitio N ("nucleotide-binding site"). Se cree que para que ocurra la escisión, el extremo 3' bloqueado del iniciador debería situarse en el sitio N (Sarafianos *et al.*, 2003, 2004). La estructura cristalográfica de la RT del VIH-1

formando un complejo N, ha proporcionado detalles moleculares de la unión a este sitio de un iniciador bloqueado con AZTMP (Sarafianos *et al.*, 2002). De acuerdo con esta estructura, las cadenas laterales de los residuos catalíticos Asp-110 y Asp-185 estarían cercanas al fósforo quiral implicado en el enlace internucleotídico. Modelando el grupo BH₃ como el diastereoisómero S_p en el enlace internucleotídico (asumiendo que se produce una inversión de la configuración después de la incorporación de α -(R_p)-BH₃-AZTTP), se puede observar que este sustituyente se posiciona hacia el lado contrario del sitio catalítico de la polimerasa, y más cercano a los residuos del subdominio “fingers” de la RT (Figura 39).

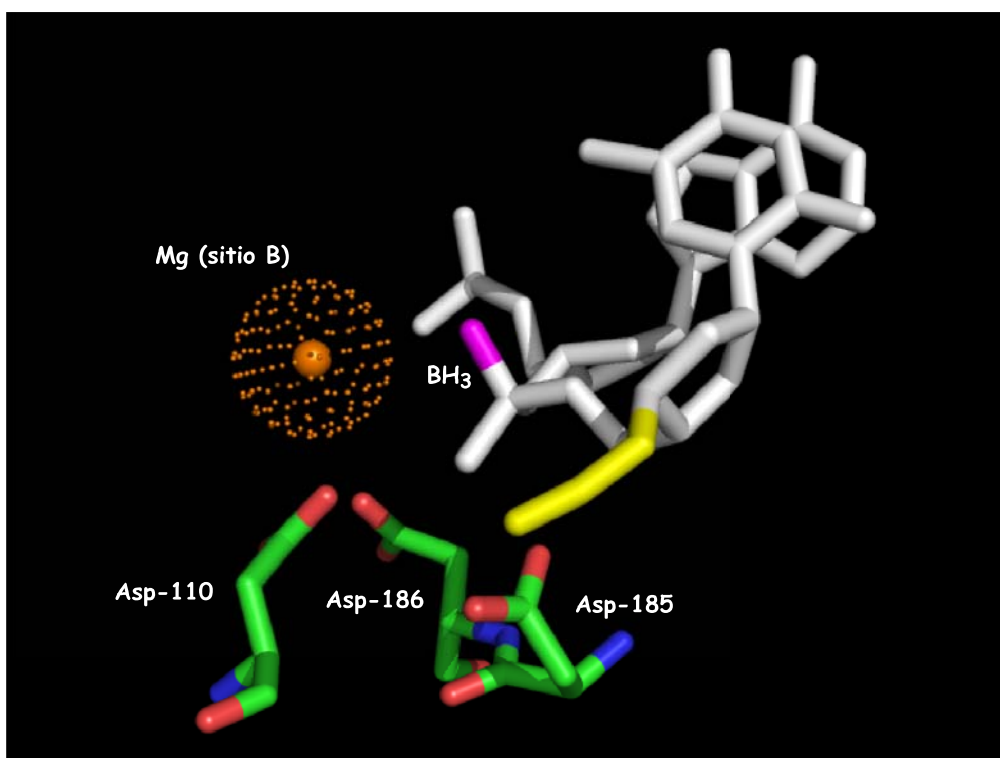


Figura 39. Modelo que muestra la localización de un iniciador bloqueado con AZTMP en el complejo ternario RT-DNA/DNA-dTTP del VIH-1 (PDB 1N6Q) (Sarafianos *et al.*, 2002). Se muestran los dos últimos nucleótidos (en blanco) del extremo 3' del iniciador. El AZTMP se encuentra en el sitio N. En amarillo se representa el grupo azido del AZT y en morado el grupo borano (BH₃) en su conformación S_p (resultado de la incorporación de α -(R_p)-BH₃-AZTTP). Esta figura se ha realizado con el programa “PyMOL Molecular Graphics System” (DeLano Scientific).

La RT multirresistente SS no muestra preferencia por un diastereoisómero específico (α -(R_p)-BH₃-AZTMP o α -(S_p)-BH₃-AZTMP), puesto que ambos son buenos sustratos de la escisión dependiente de ATP. Sin embargo, se encontraron diferencias pequeñas, pero significativas, en la susceptibilidad a la inhibición por el siguiente dNTP complementario, siendo los iniciadores bloqueados con α -(R_p)-BH₃-AZTMP los más resistentes a esta inhibición.

Las cinéticas de escisión obtenidas con los mutantes de las RTs BH10 y SS usando iniciadores bloqueados con α -boranoderivados de AZTMP fueron similares a las obtenidas con los iniciadores bloqueados con AZTMP. Sin embargo, se observaron diferencias respecto al mutante SS_2S0S. Utilizando iniciadores bloqueados con AZTMP, al eliminar la inserción de dos aminoácidos entre los codones 69 y 70 se produjo una reducción significativa en la escisión dependiente de ATP. Sin embargo, este mutante fue tan eficiente como la RT SS en el rescate de iniciadores bloqueados con α -(R_p)-BH₃-AZTMP y α -(S_p)-BH₃-AZTMP.

A diferencia de lo que ocurre con el AZTTP, la introducción del grupo BH₃ en el fosfato α del d4TTP no tuvo grandes efectos en las cinéticas de rescate de las RTs BH10, SS y sus mutantes. Las cinéticas fueron bastante similares a las obtenidas con d4T. Además, la inhibición de esta reacción por el siguiente dNTP complementario no se vio afectada ni por la introducción del grupo BH₃, ni por la quiralidad del fósforo implicado en el enlace.

Las diferencias observadas en el comportamiento de los derivados de AZT en comparación con los derivados de d4T, podría estar relacionado con el equilibrio de translocación. En presencia de bajas concentraciones del siguiente dNTP complementario, los iniciadores bloqueados con AZTMP presentan una preferencia por el sitio N, que no se observó, por ejemplo, con iniciadores bloqueados con ddTMP (Marchand y Götte, 2003), y probablemente con d4T y otros inhibidores, cuyo rescate es muy sensible a la inhibición por el siguiente dNTP complementario (Mas *et al.*, 2002). En el sitio P, la quiralidad del fósforo implicado en el enlace fosfodiéster debería tener una influencia pequeña en las propiedades cinéticas de la RT, ya que los oxígenos están relativamente alejados del Mg²⁺ y de los residuos catalíticos.

5.2.3 Introducción de un azufre en el fosfato α del AZTTP y su impacto en la actividad fosforolítica de RTs multirresistentes

Se tiene constancia de que solamente el diastereoisómero S_p de un nucleósido α -tiotrifosfato es un buen sustrato para DNA polimerasas tales como el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, la DNA polimerasa de T7 o la *Taq* DNA polimerasa (revisado en: Eckstein, 1985; Verma y Eckstein, 1998). Los datos obtenidos en esta Tesis muestran que la RT del VIH-1 es capaz de incorporar los dos diastereoisómeros del AZTTP α S, aunque la velocidad de incorporación es mayor para

el diastereoisómero S_p . Esta observación es consistente con un trabajo anterior que reveló que la RT WT del VIH-1 incorpora el diastereoisómero S_p con una eficiencia catalítica (k_{pol}/K_d) 12 veces mayor que la obtenida para el diastereoisómero R_p (Sluis-Cremer y Parniak, 2004).

El azufre presenta un tamaño ligeramente mayor que el oxígeno. Al igual que el grupo borano, el azufre y el oxígeno son isoelectrónicos, aunque en los fosforotioatos la carga negativa se encuentra polarizada hacia el azufre, al contrario de lo que ocurre con los boranofosfatos.

Es importante resaltar que en un nucleósido α -fosforotioato, el isómero S_p es equivalente al R_p de los α -boranofosfatos, y por tanto, que la eficiencia de incorporación del isómero R_p se encuentre reducida, es consistente con la modificación en la coordinación del Mg^{2+} en el sitio catalítico (Figura 39). De la misma forma, la incorporación del diastereoisómero S_p del AZTTP α S por la RT del VIH-1 conduce a la formación de un fosforotioato con un enlace R_p .

La RT multirresistente SS no fue capaz de eliminar ninguno de los diastereoisómeros del AZTMP α S de iniciadores bloqueados con este inhibidor, ni en presencia de ATP ni de PPi. La incorporación del AZTTP α S también inhibió la actividad fosforolítica dependiente de PPi que presenta la RT BH10 con otros análogos a timidina, como AZT y d4T.

Estos resultados sugieren una posible estrategia para interferir con la reacción de escisión. Derivados de nucleósidos 5'-monofosforotioatos que actúen como terminadores de cadena, o tioderivados de nucleósidos fosfonatos acíclicos (derivados de adefovir o tenofovir) podrían ser potencialmente desarrollados para inhibir la replicación de virus que contengan RTs con una elevada actividad fosforolítica dependiente de ATP, como la RT SS. Sin embargo, existen problemas derivados de su administración a células y toxicidad, que hacen difícil su desarrollo clínico posterior.

5.3. Fidelidad de RTs portadoras de cambios en la posición 75

Cuando se produce la unión del dNTP, la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ (residuos 56-77) del subdominio “fingers” sufre un notable cambio conformacional (Figura 37) (Huang *et al.*, 1998; Mendieta *et al.*, 2007). Los residuos que forman esta horquilla están

normalmente implicados en resistencia a análogos a nucleósido (Menéndez-Arias *et al.*, 2006; Cases-González *et al.*, 2007), bien porque contactan directamente con el dNTP entrante o bien porque influyen indirectamente en su unión vía interacciones con el molde DNA. La Val-75 se localiza en esta horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ (Figura 40A).

El análisis mutacional de la Val-75 de la RT del VIH-1, realizado en este trabajo, ha revelado que esta posición es bastante tolerante a los cambios, aunque algunas mutaciones parecen tener influencia en la especificidad de nucleótido y en la fidelidad de copia del DNA. Así, la sustitución de la Val-75 por Ile o Phe aumenta la fidelidad de copia de la polimerasa, mientras que cuando se sustituye por Ala conduce a una modesta pero significativa reducción de la fidelidad de la enzima.

La comparación de las estructuras cristalográficas de los complejos binario y ternario de la RT del VIH-1 muestra que el extremo 5' desapareado del molde queda más cercano al esqueleto peptídico de la Val-75 en el complejo ternario. Varios átomos de carbono de la ribosa del nucleótido en la posición +1 están localizados a menos de 4 Å del grupo -CO- de la Val-75 (Huang *et al.*, 1998), con el átomo C1' de la ribosa a una distancia de 3,44 Å del grupo -CO- de la Val-75 (Figura 40B).

Sin embargo, en los complejos binarios de la RT del VIH-1 en los que aparece un DNA de doble cadena se observa que la distancia es mayor entre la ribosa del nucleótido +1 del molde y el esqueleto peptídico de la Val-75. Así, en complejos que contienen un DNA de doble cadena que presentan sólo un nucleótido desapareado en el extremo 5' (Ding *et al.*, 1998), el esqueleto peptídico de la Val-75 se encuentra a 4,29 Å del C5' de la ribosa, mientras que en promedio el anillo de ribosa está a más 5,5 Å de distancia del grupo -CO- de la Val-75 (Figura 40D). Por otro lado, se obtuvieron distancias parecidas en esta estructura cristalográfica de un complejo binario formado por la RT del VIH-1 y un molde-iniciador RNA/DNA, que también presentaba un único nucleótido desapareado en el extremo 5' (Sarafianos *et al.*, 2001).

Es interesante destacar que en un complejo binario RT-DNA/DNA con tres nucleótidos desapareados en el extremo 5' del molde, la interacción entre los grupos -NH- y -CO- del esqueleto peptídico de la Val-75 y la Gln-151 se mantuvo, pero el grupo -CO- de la Val-75 se encontró más cercano a la base nitrogenada del nucleótido +1 del molde que al anillo de ribosa (Sarafianos *et al.*, 2001) (comparar paneles C y D en la Figura 40). Todas estas observaciones sugieren que la Val-75 presenta un papel

en el posicionamiento del nucleótido +1 del molde, una vez que el complejo ternario está formado. Además, la cadena lateral de la Val-75 interacciona con las cadenas laterales de residuos como Val-60, Phe-77 o Tyr-146, que son importantes para mantener la estructura del subdominio "fingers" (Selmi *et al.*, 2001a).

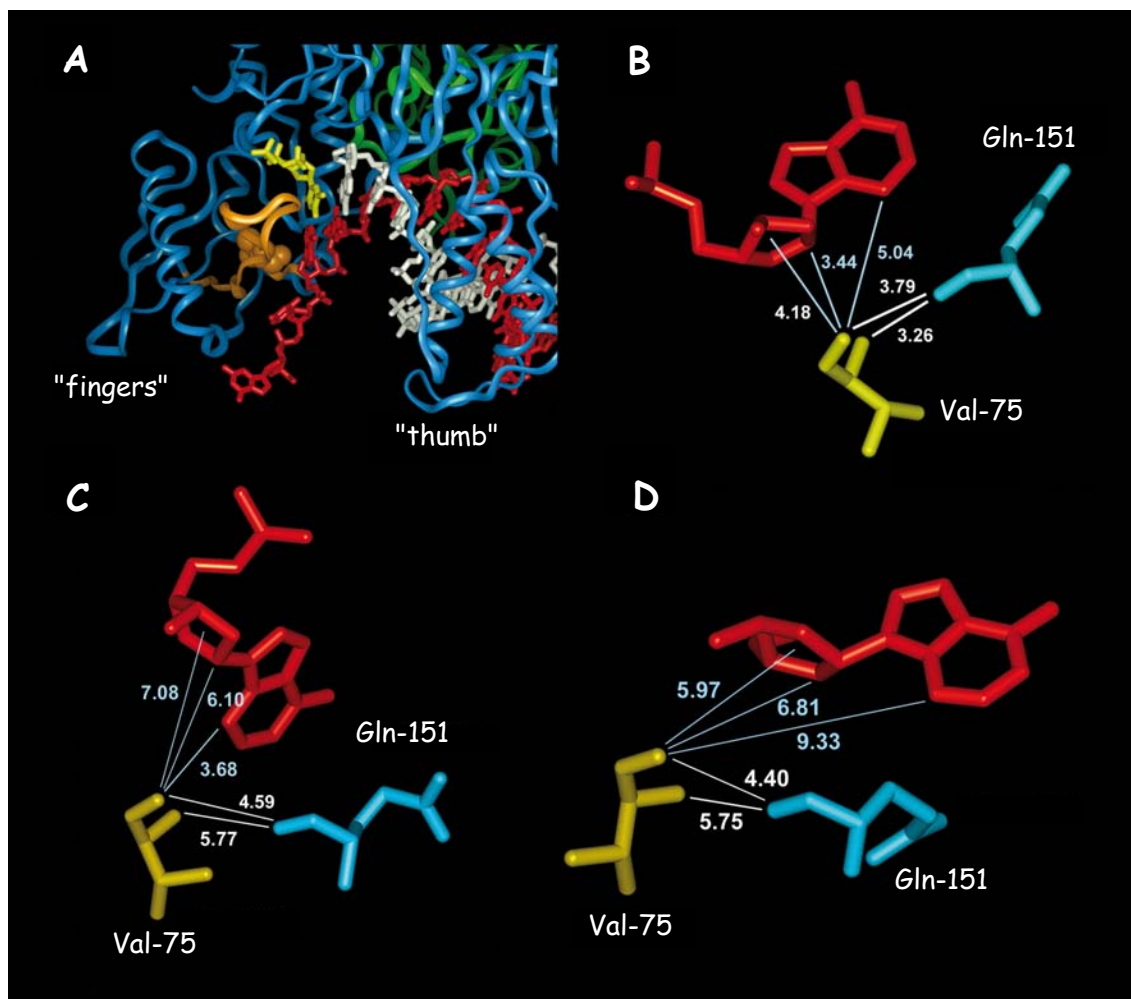


Figura 40. Interacciones entre el esqueleto peptídico de la Val-75 de la RT del VIH-1 y los átomos vecinos. (A) Vista de la RT mostrando la localización del complejo molde-iniciador (molde en rojo e iniciador en blanco) y el dNTP entrante (amarillo). Las subunidades de 66 y 51 kDa de la RT se representan en azul y verde respectivamente. La horquilla $\beta 3\text{-}\beta 4$ (representada en naranja) contiene la Val-75, que se representa con un modelo CPK. Localización de los residuos Val-75 (amarillo), Gln-151 (azul) y el nucleótido +1 del molde (rojo) en las estructuras cristalográficas del complejo ternario RT-DNA/DNA-dTTP (código PDB 1RTD) (Huang *et al.*, 1998) (B), y de los complejos binarios RT-DNA/DNA (C y D). La estructura mostrada en (C) (código PDB 1R0A) contiene tres nucleótidos en el extremo 5' despareado del molde (Sarafianos *et al.*, 2001), mientras que la estructura de (D) (código PDB 2HMI) sólo presenta uno (Ding *et al.*, 1998). Los modelos se han preparado usando el programa Insight II (Accelrys Inc.).

Los efectos producidos por la sustitución de la Val-75 por Ala, Ile o Phe, se observaron de manera consistente en los distintos ensayos realizados: (i) extensión de iniciadores en ausencia de un dNTP, (ii) incorporación de nucleótidos incorrectos y extensión de extremos despareados en condiciones de estado estacionario, (iii)

incorporación de nucleótidos incorrectos y extensión de extremos desapareados en condiciones de estado pre-estacionario, y (iv) ensayos genéticos. Los efectos mayores se observaron con el mutante BH10_V75I que mostró un aumento de 3 veces respecto a la RT BH10, en la fidelidad de copia medida mediante un ensayo genético de introducción de mutaciones. Se observó un aumento similar (3,5 veces), también con este mutante, en un ensayo genético de reversión de mutaciones.

Para que una mutación sea fijada en el DNA son necesarios dos eventos: en primer lugar, la incorporación errónea de un nucleótido y a continuación la extensión del extremo desapareado que se ha generado (Menéndez-Arias, 2002b; Kunkel, 2004; Rezende y Prasad, 2004). Para conocer el mecanismo por el cual los cambios en la posición Val-75 alteran la fidelidad de copia de la RT BH10, se llevaron a cabo ensayos cinéticos. Los parámetros cinéticos, obtenidos en condiciones de estado estacionario, mostraron que el incremento en la fidelidad de los mutantes BH10_V75F y BH10_V75I fue consecuencia de sus bajas eficiencias de extensión de extremos desapareados (f_{ext}), en comparación con los obtenidos con la RT BH10. Sin embargo, la interpretación mecanística basada en los datos obtenidos en el estado estacionario (K_m y k_{cat}) es problemática, ya que diferencias en el valor de K_m no implican diferencias en la afinidad de unión del dNTP.

Por tanto, para determinar qué etapa estaba realmente implicada en la producción de un error, se realizó un análisis cinético en el estado pre-estacionario para la incorporación de dNTPs por parte de las RTs mutantes portadoras de cambios en la posición 75. Como se muestra en la Figura 41, las mutaciones que confieren mayor fidelidad de copia (V75F y V75I) mostraron valores de f_{ext} significativamente menores que las obtenidas con la enzima BH10, tanto en condiciones de estado pre-estacionario como estacionario, sin presentar un gran impacto en la incorporación errónea.

Bajo condiciones de estado pre-estacionario, la enzima portadora del cambio V75I mostró valores de f_{ext} alrededor de 3 a 5 veces menores que los obtenidos con la RT BH10 para los extremos desapareados G:T, G:G y G:A. Este aumento en la fidelidad de la copia fue debido al gran incremento del valor de la K_d para el nucleótido correcto en reacciones de extensión de complejos DNA/DNA con el extremo 3' desapareado, respecto a la enzima BH10 (Tabla 11). Sin embargo, el mutante BH10_V75I presentó valores de eficiencia catalítica para la incorporación de dTTP en

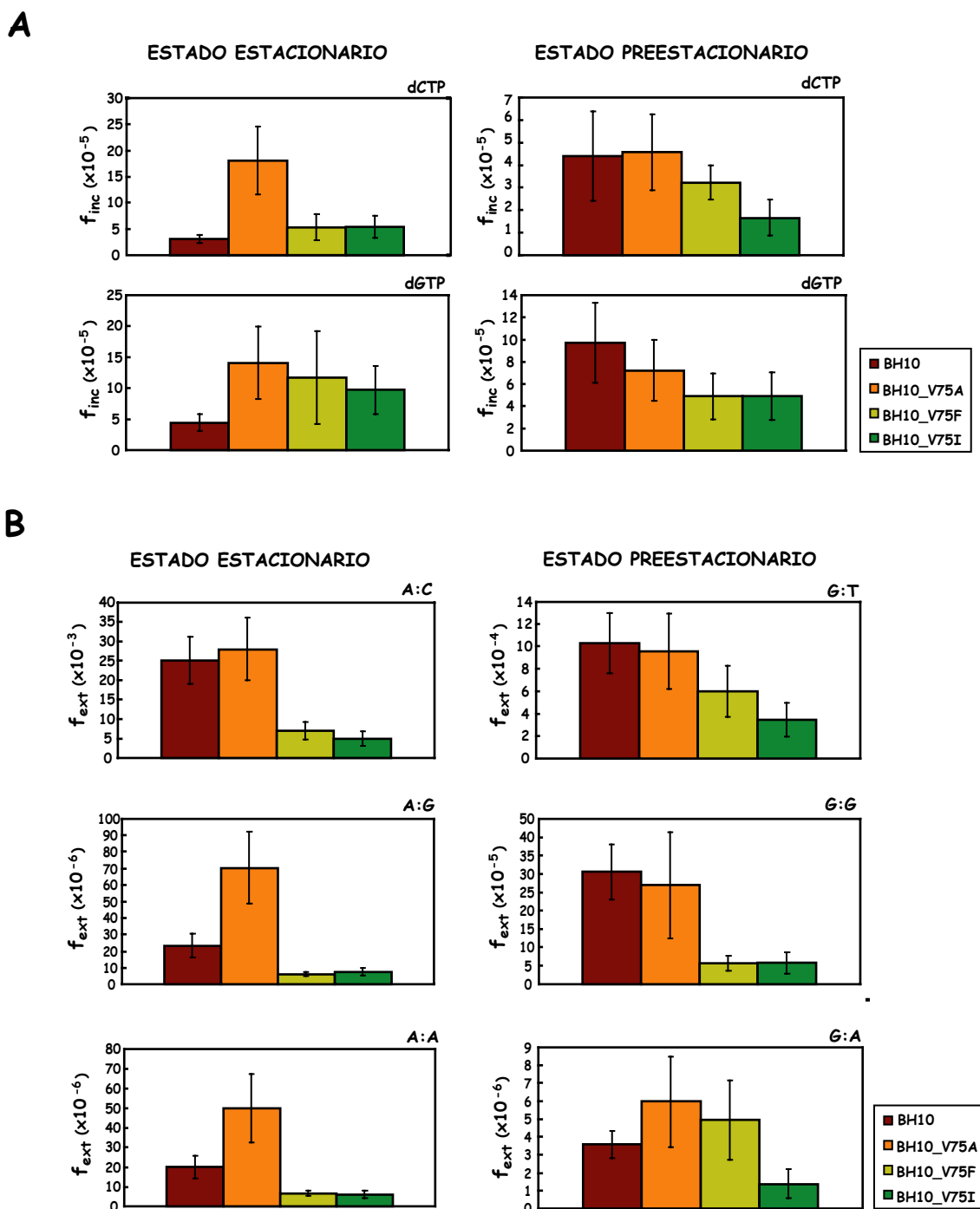


Figura 41. Efecto de mutaciones en la Val-75 de la RT del VIH-1 sobre la fidelidad de copia de DNA. Eficiencias de incorporación errónea (f_{inc}) (A) y eficiencias de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) (B) para la RT BH10 y los mutantes con los cambios V75A, V75F y V75I determinadas mediante cinéticas en estado estacionario (izquierda) y pre-estacionario (derecha).

complejos correctamente apareados (G:C) y de k_{pol} para la incorporación de un nucleótido correcto en un complejo molde-iniciador desapareado en su extremo 3' similares a la RT BH10 (Tabla 11). El cambio V75F también provocó un aumento en la fidelidad, aunque en este caso, sólo se observaron diferencias significativas para el

extremo desapareado G:G (Figura 41). Como en el caso del mutante BH10_V75I, la K_d para el nucleótido correcto aumentó alrededor de 5 veces, aunque también se observó una reducción de 3 veces en la k_{pol} para la incorporación de dTTP en un extremo desapareado G:G (Tabla 11).

Aunque los análisis cinéticos en el estado estacionario han sido ampliamente utilizados para el análisis de la fidelidad de copia de la RT del VIH-1, existen muy pocos estudios cinéticos en el estado pre-estacionario que analicen los efectos de mutaciones sobre la fidelidad de copia de esta enzima. Así, Feng y Anderson (1999) analizaron los efectos de la mutación de resistencia a lamivudina M184V en ensayos de incorporación errónea. Los autores mostraron que esta mutación presentaba un pequeño efecto en la capacidad de la RT para discriminar entre nucleótidos correctos e incorrectos. Se llevaron a cabo estudios similares con los mutantes V148I y Q151N (Weiss *et al.*, 2002, 2004). Estos estudios revelaron pequeñas diferencias en la selectividad de nucleótido entre ambos mutantes y la enzima WT, aunque V148I y Q151N mostraron una eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) reducida en comparación con la RT WT (Weiss *et al.*, 2004). En el caso de Q151N, este efecto fue atribuido a su elevada K_d para el nucleótido correcto cuando se usó como sustrato un complejo molde-iniciador DNA/DNA desapareado en su extremo 3'. Estos efectos son similares a los obtenidos en esta Tesis con la RT portadora del cambio V75I. Sin embargo, la eficiencia catalítica de Q151N fue mucho menor que la de la RT WT (Weiss *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004), sugiriendo que la aparición de esta mutación *in vivo* es poco probable debido a su efecto perjudicial en la afinidad por el dNTP. En contrate, BH10_V75I y otros mutantes de esta posición retienen actividad DNA polimerasa significativa en ensayos de incorporación llevados a cabo en varias condiciones de ensayo diferentes (Tabla 7, Tabla 11 y Figura 31).

Nuestros resultados también fueron consistentes con la variabilidad en la posición 75 observada *in vivo*. Virus mutantes portadores de las mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales V75I y V75T replican eficientemente en varios tipos celulares (Maeda *et al.*, 1999; Selmi *et al.*, 2001a). V75I aparece como una mutación secundaria en variantes del VIH-1 resistentes a múltiples didesoxiribonucleósidos (Shirasaka *et al.*, 1995; Iversen *et al.*, 1996) y como una mutación compensatoria en virus portadores de RTs con el cambio G190E, que es una mutación que confiere resistencia a varios inhibidores no análogos a nucleósido (Kleim *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 1998). En el caso de RTs multirresistentes, V75I aparece

junto con Q151M y probablemente afecta a la unión del dNTP alterando las interacciones de Gln-151 con la base nitrogenada del nucleótido entrante, así como otras interacciones con el núcleo hidrofóbico ("core") del subdominio "fingers" (p. ej. con la cadena lateral de Phe-77). Por otro lado, su efecto compensatorio en virus portadores de la mutación G190E podría estar relacionado con el posicionamiento del complejo molde-iniciador. Aunque el esqueleto peptídico de la Val-75 interacciona con el extremo 5' desapareado del molde en el complejo ternario de la RT del VIH-1, no podemos descartar un efecto indirecto sobre la Gln-151 y otros residuos del sitio de unión del dNTP, que podrían tener que ver con las diferencias observadas en la fidelidad de copia de las RTs analizadas.

Ya que la elevada diversidad genética del VIH-1 se debe principalmente a la alta tasa de error que presenta la RT, un aumento en la fidelidad de copia de esta enzima implicaría una menor capacidad para generar cambios, y con ello una menor diversidad en la población viral. Este podría ser un mecanismo para retrasar la aparición de resistencia a fármacos antirretrovirales (Wainberg *et al.*, 1996). Sin embargo, según modelos teóricos, para que la fidelidad de copia de la RT tenga impacto en la tasa de aparición de variantes virales es necesario un incremento muy significativo de esta fidelidad (Preston, 1997). Por otro lado, con la introducción de mutaciones que confieran mayor fidelidad de copia en el contexto de RTs más estables, se podrían obtener polimerasas potencialmente útiles en reacciones de amplificación de RNA, de evidente interés biotecnológico.

Los datos presentados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la gran importancia de los residuos que forman la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ del subdominio "fingers" de la RT del VIH-1, ya que se ha demostrado su implicación tanto en resistencia a NRTIs (inserciones entre residuos 69 y 70) como en fidelidad de copia (Val-75). Además, se ha encontrado un nuevo compuesto capaz de inhibir el mecanismo de escisión, responsable de la resistencia a análogos a timidina. Este resultado se propone como una aproximación terapéutica que podría servir de base para el desarrollo de nuevas estrategias antirretrovirales.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La sustitución de la Tyr-215 por Thr, Ser o Asn en una RT multirresistente, portadora de una inserción Ser-Ser entre los codones 69 y 70, conduce a la pérdida de resistencia a AZT y d4T, a través de la pérdida de su actividad fosforolítica dependiente de ATP. La Tyr-215 es crítica para mantener la actividad fosforolítica implicada en el mecanismo de escisión de inhibidores análogos a timidina.
2. La Tyr-215 junto con la inserción Ser-Ser, en el contexto de secuencia de la RT WT, confiere niveles significativos de escisión mediada por ATP. Sin embargo, estos niveles no alcanzaron los presentados por la RT multirresistente SS, lo que sugiere que otras mutaciones de resistencia a análogos de timidina deben contribuir a este mecanismo de resistencia.
3. Tanto la Tyr-215 como la inserción Ser-Ser afectan a la formación del complejo ternario RT-DNA/DNA-dNTP, a la que contribuye significativamente la molécula donadora de PPi, ya que este efecto se pierde en presencia de foscarnet, o no se detecta en ensayos catalíticos realizados en presencia de un donador de PPi.
4. La mutación D67N, que se encuentra muy raramente asociada a RTs portadoras de inserciones en el subdominio "fingers", no afecta a los niveles de actividad fosforolítica dependiente de ATP de la RT SS.
5. Los átomos de oxígeno del fosfato γ de las moléculas trifosfato, que actúan como donadores de PPi en la reacción de escisión, son importantes para mantener la eficiencia de esta reacción.
6. La sustitución de un oxígeno por un grupo BH₃ en el fosfato α del AZT-trifosfato o del d4T-trifosfato no afecta significativamente a la capacidad de escisión de la RT SS.
7. El mecanismo de escisión y por tanto la resistencia a AZT de la RT SS fue completamente eliminada, cuando se usó como inhibidor el AZT-trifosfato con un azufre en su fosfato α (3'-azido-3'-desoxitimidin-5'-O-(1-tio)-trifosfato).
8. El cambio de Val por Ile o Phe en la posición 75, produce un aumento de 1,8 y 3 veces respectivamente, en la fidelidad de copia de la RT del VIH-1, en ensayos genéticos. Los estudios cinéticos, tanto en estado estacionario como pre-estacionario, demuestran que dichas mutaciones no alteran la capacidad de la enzima para discriminar entre nucleótidos correctos e incorrectos, pero sí disminuye la capacidad de ésta para extender extremos desapareados (etapa necesaria para la fijación de mutaciones).
9. El mutante con el cambio V75A es 1,4 veces menos fiel que la enzima BH10 en un ensayo genético. Los ensayos cinéticos muestran que en esta disminución de fidelidad de copia están implicadas las dos etapas que llevan a la fijación de mutaciones.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Adamson, C. S. y Freed, E. O. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol* **55**, 347-387.

Agopian, A., Depollier, J., Lionne, C. y Divita, G. (2007). p66 Trp24 and Phe61 are essential for accurate association of HIV-1 reverse transcriptase with primer/template. *J Mol Biol* **373**, 127-140.

Andreoletti, L., Weiss, L., Si-Mohamed, A., Piketty, C., Prazuck, T., Calamy, G., Malkin, J. E., Matta, M., Mbopi-Keou, F. X., Clavel, F., Kazatchkine, M. D. y Belec, L. (2002). Multidrug-resistant HIV-1 RNA and proviral DNA variants harboring new dipeptide insertions in the reverse transcriptase *pol* gene. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 102-104.

Arenzana-Seisdedos, F. y Parmentier, M. (2006). Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol* **18**, 387-403.

Arion, D., Borkow, G., Gu, Z., Wainberg, M. A. y Parniak, M. A. (1996). The K65R mutation confers increased DNA polymerase processivity to HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **271**, 19860-19864.

Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G. y Parniak, M. A. (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* **37**, 15908-15917.

Arion, D., Sluis-Cremer, N. y Parniak, M. A. (2000). Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **275**, 9251-9255.

Arts, E. J., Ghosh, M., Jacques, P. S., Ehresmann, B. y Le Grice, S. F. (1996). Restoration of tRNA₃^{Lys}-primed(-)-strand DNA synthesis to an HIV-1 reverse transcriptase mutant with extended tRNAs. Implications for retroviral replication. *J Biol Chem* **271**, 9054-9061.

Arts, E. J. y Wainberg, M. A. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription. *Adv Virus Res* **46**, 97-163.

Astatke, M., Grindley, N. D. y Joyce, C. M. (1995). Deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate binding sites in the catalytically competent ternary complex for the polymerase reaction catalyzed by DNA polymerase I (Klenow fragment). *J Biol Chem* **270**, 1945-1954.

Bakhanashvili, M., Avidan, O. y Hizi, A. (1996). Mutational studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: the involvement of residues 183 and 184 in the fidelity of DNA synthesis. *FEBS Lett* **391**, 257-262.

Bakhanashvili, M. y Hizi, A. (1992). Fidelity of the RNA-dependent DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptases of human immunodeficiency virus types 1 and 2 and of murine leukemia virus: mispair extension frequencies. *Biochemistry* **31**, 9393-9398.

Balotta, C., Violin, M., Monno, L., Bagnarelli, P., Riva, C., Facchi, G., Berlusconi, A., Lippi, M., Rusconi, S., Clementi, M., Galli, M., Angarano, G. y Moroni, M. (2000). Prevalence of multiple dideoxynucleoside analogue resistance (MddNR) in a multicenter cohort of HIV-1-infected Italian patients with virologic failure. *J Acquir Immune Defic Syndr* **24**, 232-240.

Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.

Balzarini, J. (2004). Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Curr Top Med Chem* **4**, 921-944.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. y Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

Barshop, B. A., Adamson, D. T., Vellom, D. C., Rosen, F., Epstein, B. L. y Seegmiller, J. E. (1991). Luminescent immobilized enzyme test systems for inorganic pyrophosphate: assays using firefly luciferase and nicotinamide-mono-nucleotide adenylyl transferase or adenosine-5'-triphosphate sulfurylase. *Anal Biochem* **197**, 266-272.

Basavapathruni, A. y Anderson, K. S. (2007). Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J* **21**, 3795-3808.

Bazmi, H. Z., Hammond, J. L., Cavalcanti, S. C., Chu, C. K., Schinazi, R. F. y Mellors, J. W. (2000). *In vitro* selection of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that decrease susceptibility to (-)- β -D-dioxolane-guanosine and suppress resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1783-1788.

Beard, W. A., Minnick, D. T., Wade, C. L., Prasad, R., Won, R. L., Kumar, A., Kunkel, T. A. y Wilson, S. H. (1996). Role of the "helix clamp" in HIV-1 reverse transcriptase catalytic cycling as revealed by alanine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **271**, 12213-12220.

Beard, W. A., Stahl, S. J., Kim, H. R., Bebenek, K., Kumar, A., Strub, M. P., Becerra, S. P., Kunkel, T. A. y Wilson, S. H. (1994). Structure/function studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. Alanine scanning mutagenesis of an α -helix in the thumb subdomain. *J Biol Chem* **269**, 28091-28097.

Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1995). Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods Enzymol* **262**, 217-232.

Beckman, R. A., Mildvan, A. S. y Loeb, L. A. (1985). On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis *in vitro*. *Biochemistry* **24**, 5810-5817.

Bethell, R. C., Lie, Y. S. y Parkin, N. T. (2005). *In vitro* activity of SPD754, a new deoxycytidine nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), against 215 HIV-1 isolates resistant to other NRTIs. *Antivir Chem Chemother* **16**, 295-302.

Bonfanti, P., Faggion, I., La Seta Catamancio, S., Violin, M., Balotta, C. y Rusconi, S. (2000). Response to antiretroviral therapy in a patient with an uncommon codon 69 insertion in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1767.

- Boretto, J., Longhi, S., Navarro, J. M., Selmi, B., Sire, J. y Canard, B. (2001). An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Anal Biochem* **292**, 139-147.
- Boyer, J. C., Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1992). Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6919-6923.
- Boyer, P. L., Ferris, A. L., Clark, P., Whitmer, J., Frank, P., Tantillo, C., Arnold, E. y Hughes, S. H. (1994). Mutational analysis of the fingers and palm subdomains of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Mol Biol* **243**, 472-483.
- Boyer, P. L., Gao, H. Q. y Hughes, S. H. (1998). A mutation at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase interacts with mutations at positions 74 and 75 via the template primer. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 447-452.
- Boyer, P. L. y Hughes, S. H. (2000). Effects of amino acid substitutions at position 115 on the fidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **74**, 6494-6500.
- Boyer, P. L., Imamichi, T., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Hughes, S. H. (2004). Effects of the $\Delta 67$ complex of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on nucleoside analog excision. *J Virol* **78**, 9987-9997.
- Boyer, P. L., Julias, J. G., Marquez, V. E. y Hughes, S. H. (2005). Fixed conformation nucleoside analogs effectively inhibit excision-proficient HIV-1 reverse transcriptases. *J Mol Biol* **345**, 441-450.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Hughes, S. H. (2000). Analysis of mutations at positions 115 and 116 in the dNTP binding site of HIV-1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3056-3061.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Hughes, S. H. (2001). Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **75**, 4832-4842.
- Briones, C., Mas, A., Gómez-Mariano, G., Altisent, C., Menéndez-Arias, L., Soriano, V. y Domingo, E. (2000). Dynamics of dominance of a dipeptide insertion in reverse transcriptase of HIV-1 from patients subjected to prolonged therapy. *Virus Res* **66**, 13-26.
- Briones, C., Mas, A., Pérez-Olmeda, M., Altisent, C., Domingo, E. y Soriano, V. (2001). Prevalence and genetic heterogeneity of the reverse transcriptase T69S-S-X insertion in pretreated HIV-infected patients. *Intervirology* **44**, 339-343.
- Bulgheroni, E., Croce, F., Citterio, P., Vigano, O., Visona, R., Sala, E., Galli, M. y Rusconi, S. (2004). Unusual codon 69 insertions: influence on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase drug susceptibility. *J Clin Virol* **29**, 27-32.
- Calvez, V., Costagliola, D., Descamps, D., Yvon, A., Collin, G., Cecile, A., Delaugerre, C., Damond, F., Marcelin, A. G., Matheron, S., Simon, A., Valantin, M. A., Katlama, C. y Brun-Vézinet, F. (2002). Impact of stavudine phenotype and thymidine analogues mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial. *Antivir Ther* **7**, 211-218.

Canard, B., Chowdhury, K., Sarfati, R., Doublie, S. y Richardson, C. C. (1999). The motif D loop of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is critical for nucleoside 5'-triphosphate selectivity. *J Biol Chem* **274**, 35768-35776.

Carpenter, C. C., Cooper, D. A., Fischl, M. A., Gatell, J. M., Gazzard, B. G., Hammer, S. M., Hirsch, M. S., Jacobsen, D. M., Katzenstein, D. A., Montaner, J. S., Richman, D. D., Saag, M. S., Schechter, M., Schooley, R. T., Thompson, M. A., Vella, S., Yeni, P. G. y Volberding, P. A. (2000). Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-U S A Panel. *JAMA* **283**, 381-390.

Carroll, S. S., Geib, J., Olsen, D. B., Stahlhut, M., Shafer, J. A. y Kuo, L. C. (1994). Sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase and its mutants to inhibition by azidothymidine triphosphate. *Biochemistry* **33**, 2113-2120.

Cases-González, C. E., Franco, S., Martínez, M. A. y Menéndez-Arias, L. (2007). Mutational patterns associated with the 69 insertion complex in multi-drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase that confer increased excision activity and high-level resistance to zidovudine. *J Mol Biol* **365**, 298-309.

Cases-González, C. E., Gutiérrez-Rivas, M. y Menéndez-Arias, L. (2000). Coupling ribose selection to fidelity of DNA synthesis. The role of Tyr-115 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **275**, 19759-19767.

Cases-González, C. E. y Menéndez-Arias, L. (2005). Nucleotide specificity of HIV-1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Ala-114. *Biochem J* **387**, 221-229.

Chamberlain, P. P., Ren, J., Nichols, C. E., Douglas, L., Lennerstrand, J., Larder, B. A., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2002). Crystal structures of zidovudine- or lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases containing mutations at codons 41, 184, and 215. *J Virol* **76**, 10015-10019.

Coakley, E. P., Gillis, J. M. y Hammer, S. M. (2000). Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *AIDS* **14**, F9-15.

Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**, 483-489.

Crabtree, R. H., Siegbahn, P. E. M., Eisenstein, O., Rheingold, A. L. y Koetzle, T. F. (1996). A new intermolecular interaction: unconventional hydrogen bonds with element hydride-bonds as proton acceptor. *Accts. Chem. Res* **29**, 348-354.

Cruchaga, C., Anso, E., Rouzaut, A. y Martínez-Irujo, J. J. (2006). Selective excision of chain-terminating nucleotides by HIV-1 reverse transcriptase with phosphonoformate as substrate. *J Biol Chem* **281**, 27744-27752.

Curr, K., Tripathi, S., Lennerstrand, J., Larder, B. A. y Prasad, V. R. (2006). Influence of naturally occurring insertions in the fingers subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on polymerase fidelity and mutation frequencies *in vitro*. *J Gen Virol* **87**, 419-428.

Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. y Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.

- Das, K., Ding, J., Hsiou, Y., Clark, A. D., Jr., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Pauwels, R., Janssen, P. A., Boyer, P. L., Clark, P., Smith, R. H., Jr., Kroeger Smith, M. B., Michejda, C. J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1996). Crystal structures of 8-Cl and 9-Cl TIBO complexed with wild-type HIV-1 RT and 8-Cl TIBO complexed with the Tyr181Cys HIV-1 RT drug-resistant mutant. *J Mol Biol* **264**, 1085-1100.
- Das, K., Lewi, P. J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2005). Crystallography and the design of anti-AIDS drugs: conformational flexibility and positional adaptability are important in the design of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Prog Biophys Mol Biol* **88**, 209-231.
- Das, K., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2007). Crystal structures of clinically relevant Lys103Asn/Tyr181Cys double mutant HIV-1 reverse transcriptase in complexes with ATP and non-nucleoside inhibitor HBY 097. *J Mol Biol* **365**, 77-89.
- De Antoni, A., Folli, A., Lisiewicz, J. y Lori, F. (1997). Mutations in the *pol* gene of human immunodeficiency virus type 1 in infected patients receiving didanosine and hydroxyurea combination therapy. *J Infect Dis* **176**, 899-903.
- De Clercq, E. (1999). Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Farmaco* **54**, 26-45.
- De Clercq, E. (2002). Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 13-25.
- De Clercq, E. y Holý, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 928-940.
- De Jong, J. J., Goudsmit, J., Lukashov, V. V., Hillebrand, M. E., Baan, E., Huismans, R., Danner, S. A., ten Veen, J. H., de Wolf, F. y Jurriaans, S. (1999). Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS* **13**, 75-80.
- De Ronde, A., van Dooren, M., van Der Hoek, L., Bouwhuis, D., de Rooij, E., van Gemen, B., de Boer, R. y Goudsmit, J. (2001). Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol* **75**, 595-602.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. y Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* **3**, 461-467.
- Depollier, J., Hourdou, M. L., Aldrian-Herrada, G., Rothwell, P., Restle, T. y Divita, G. (2005). Insight into the mechanism of a peptide inhibitor of HIV reverse transcriptase dimerization. *Biochemistry* **44**, 1909-1918.
- Deval, J., Alvarez, K., Selmi, B., Bermond, M., Boretto, J., Guerreiro, C., Mulard, L. y Canard, B. (2005). Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase using α -boranophosphate nucleoside analogs. *J Biol Chem* **280**, 3838-3846.
- Deval, J., Courcambeck, J., Selmi, B., Boretto, J. y Canard, B. (2004a). Structural determinants and molecular mechanisms for the resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues. *Curr Drug Metab* **5**, 305-316.

- Deval, J., Selmi, B., Boretto, J., Egloff, M. P., Guerreiro, C., Sarfati, S. y Canard, B. (2002). The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using α -boranophosphate nucleotide analogues. *J Biol Chem* **277**, 42097-42104.
- Deval, J., White, K. L., Miller, M. D., Parkin, N. T., Courcambeck, J., Halfon, P., Selmi, B., Boretto, J. y Canard, B. (2004b). Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. *J Biol Chem* **279**, 509-516.
- Di Marzo Veronese, F., Copeland, T. D., DeVico, A. L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R. C. y Sarngadharan, M. G. (1986). Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* **231**, 1289-1291.
- Ding, J., Das, K., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Janssen, P. A., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1995a). Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**, 407-415.
- Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, A. D., Jr., Jessen, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K., Pauwels, R., Moereels, H., Koymans, L., Janssen, P. A. J., Smith, R. H. Jr., Kroeger Koepke, M., Michejda, C. J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1995b). Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor α -APA R 95845 at 2.8 Å resolution. *Structure* **3**, 365-379.
- Ding, J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1997). Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers* **44**, 125-138.
- Domingo, E. (2003). Quasispecies and the development of new antiviral strategies. *Prog Drug Res* **60**, 133-158.
- Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E. y Manrubia, S. C. (2005). Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res* **107**, 129-139.
- Domingo, E., Escarmís, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S. F., Quer, J., Novella, I. S. y Holland, J. J. (1996). Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* **10**, 859-864.
- Domingo, E. y Holland, J. J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. En *The Evolutionary Biology of Viruses* (ed. por S.S. Morse), Raven Press, Nueva York, págs. 161-184.
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J. y Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 51-82.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. y Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- Drosopoulos, W. C. y Prasad, V. R. (1996). Increased polymerase fidelity of E89G, a nucleoside analog-resistant variant of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **70**, 4834-4838.

Drosopoulos, W. C. y Prasad, V. R. (1998). Increased misincorporation fidelity observed for nucleoside analog resistance mutations M184V and E89G in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase does not correlate with the overall error rate measured *in vitro*. *J Virol* **72**, 4224-4230.

Drosopoulos, W. C., Rezende, L. F., Wainberg, M. A. y Prasad, V. R. (1998). Virtues of being faithful: can we limit the genetic variation in human immunodeficiency virus? *J Mol Med* **76**, 604-612.

Dutschman, G. E., Grill, S. P., Gullen, E. A., Haraguchi, K., Takeda, S., Tanaka, H., Baba, M. y Cheng, Y. C. (2004). Novel 4'-substituted stavudine analog with improved anti-human immunodeficiency virus activity and decreased cytotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1640-1646.

Echols, H. y Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 477-511.

Eckstein, F. (1985). Nucleoside phosphorothioates. *Annu Rev Biochem* **54**, 367-402.

Eggink, D., Huigen, M. C., Boucher, C. A., Götte, M. y Nijhuis, M. (2007). Insertions in the β 3- β 4 loop of reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 and their mechanism of action, influence on drug susceptibility and viral replication capacity. *Antiviral Res* **75**, 93-103.

Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.

Eigen, M. y Schuster, P. (1979). *The hypercycle*. Springer Verlag, Berlin.

Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. y Stuart, D. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* **2**, 303-308.

Esnouf, R. M., Ren, J., Hopkins, A. L., Ross, C. K., Jones, E. Y., Stammers, D. K. y Stuart, D. I. (1997). Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3984-3989.

Fan, N., Rank, K. B., Slade, D. E., Poppe, S. M., Evans, D. B., Kopta, L. A., Olmsted, R. A., Thomas, R. C., Tarpley, W. G. y Sharma, S. K. (1996). A drug resistance mutation in the inhibitor binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase impairs DNA synthesis and RNA degradation. *Biochemistry* **35**, 9737-9745.

Felber, B. K., Zolotukhin, A. S. y Pavlakis, G. N. (2007). Posttranscriptional control of HIV-1 and other retroviruses and its practical applications. *Adv Pharmacol* **55**, 161-197.

Feng, J. Y. y Anderson, K. S. (1999). Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **38**, 9440-9448.

Feng, J. Y., Myrick, F. T., Margot, N. A., Mulamba, G. B., Rimsky, L., Borroto-Esoda, K., Selmi, B. y Canard, B. (2006). Virologic and enzymatic studies revealing the mechanism of K65R- and Q151M-associated HIV-1 drug resistance towards emtricitabine and lamivudine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **25**, 89-107.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. y Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.

Fisher, T. S., Darden, T. y Prasad, V. R. (2003). Substitutions at Phe61 in the $\beta 3$ - $\beta 4$ hairpin of HIV-1 reverse transcriptase reveal a role for the fingers subdomain in strand displacement DNA synthesis. *J Mol Biol* **325**, 443-459.

Fisher, T. S. y Prasad, V. R. (2002). Substitutions of Phe61 located in the vicinity of template 5'-overhang influence polymerase fidelity and nucleoside analog sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **277**, 22345-22352.

Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U. y Malim, M. H. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J* **16**, 4531-4539.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. y Markham, P. D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.

García, J. A. y Gaynor, R. B. (1994). The human immunodeficiency virus type-1 long terminal repeat and its role in gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**, 157-196.

García-Lerma, J. G., Nidtha, S., Blumoff, K., Weinstock, H. y Heneine, W. (2001). Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naïve persons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13907-13912.

Garforth, S. J., Kim, T. W., Parniak, M. A., Kool, E. T. y Prasad, V. R. (2007). Site-directed mutagenesis in the fingers subdomain of HIV-1 reverse transcriptase reveals a specific role for the $\beta 3$ - $\beta 4$ hairpin loop in dNTP selection. *J Mol Biol* **365**, 38-49.

Goldschmidt, V. y Marquet, R. (2004). Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1687-1705.

Goodman, M. F., Creighton, S., Bloom, L. B. y Petruska, J. (1993). Biochemical basis of DNA replication fidelity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**, 83-126.

Götte, M., Li, X. y Wainberg, M. A. (1999). HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* **365**, 199-210.

Goudsmit, J., Back, N. K. y Nara, P. L. (1991). Genomic diversity and antigenic variation of HIV-1: links between pathogenesis, epidemiology and vaccine development. *FASEB J* **5**, 2427-2436.

Goudsmit, J., de Ronde, A., de Rooij, E. y de Boer, R. (1997). Broad spectrum of *in vivo* fitness of human immunodeficiency virus type 1 subpopulations differing at reverse transcriptase codons 41 and 215. *J Virol* **71**, 4479-4484.

Gu, Z., Allard, B., de Muys, J. M., Lippens, J., Rando, R. F., Nguyen-Ba, N., Ren, C., McKenna, P., Taylor, D. L. y Bethell, R. C. (2006). *In vitro* antiretroviral activity and *in vitro* toxicity profile of SPD754, a new deoxycytidine nucleoside reverse transcriptase inhibitor for treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 625-631.

Gu, Z., Fletcher, R. S., Arts, E. J., Wainberg, M. A. y Parniak, M. A. (1994). The K65R mutant reverse transcriptase of HIV-1 cross-resistant to 2', 3'-dideoxycytidine, 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine, and 2',3'-dideoxyinosine shows reduced sensitivity to specific dideoxynucleoside triphosphate inhibitors *in vitro*. *J Biol Chem* **269**, 28118-28122.

Gutiérrez-Rivas, M., Ibáñez, A., Martínez, M. A., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1999). Mutational analysis of Phe160 within the "palm" subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Mol Biol* **290**, 615-625.

Gutiérrez-Rivas, M. y Menéndez-Arias, L. (2001). A mutation in the primer grip region of HIV-1 reverse transcriptase that confers reduced fidelity of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* **29**, 4963-4972.

Hamburgh, M. E., Drosopoulos, W. C. y Prasad, V. R. (1998). The influence of 3TC-resistance mutations E89G and M184V in the human immunodeficiency virus reverse transcriptase on mispair extension efficiency. *Nucleic Acids Res* **26**, 4389-4394.

Hammond, J. L., Koontz, D. L., Bazmi, H. Z., Beadle, J. R., Hostetler, S. E., Kini, G. D., Aldern, K. A., Richman, D. D., Hostetler, K. Y. y Mellors, J. W. (2001). Alkylglycerol prodrugs of phosphonoformate are potent *in vitro* inhibitors of nucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 and select for resistance mutations that suppress zidovudine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1621-1628.

Hanna, G. J., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Richman, D. D., Brown, A. J., Savara, A. V., Hazelwood, J. D. y D'Aquila, R. T. (2000). Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. *J Infect Dis* **181**, 904-911.

Harris, D., Kaushik, N., Pandey, P. K., Yadav, P. N. y Pandey, V. N. (1998a). Functional analysis of amino acid residues constituting the dNTP binding pocket of HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **273**, 33624-33634.

Harris, D., Lee, R., Misra, H. S., Pandey, P. K. y Pandey, V. N. (1998b). The p51 subunit of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential in loading the p66 subunit on the template primer. *Biochemistry* **37**, 5903-5908.

Himmel, D. M., Das, K., Clark, A. D., Jr., Hughes, S. H., Benjahad, A., Oumouch, S., Guillemont, J., Coupa, S., Poncelet, A., Csoka, I., Meyer, C., Andries, K., Nguyen, C. H., Grierson, D. S. y Arnold, E. (2005). Crystal structures for HIV-1 reverse transcriptase in complexes with three pyridinone derivatives: a new class of non-nucleoside inhibitors effective against a broad range of drug-resistant strains. *J Med Chem* **48**, 7582-7591.

Hizi, A., McGill, C. y Hughes, S. H. (1988). Expression of soluble, enzymatically active, human immunodeficiency virus reverse transcriptase in *Escherichia coli* and analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1218-1222.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. y Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126.

Hopkins, A. L., Ren, J., Esnouf, R. M., Willcox, B. E., Jones, E. Y., Ross, C., Miyasaka, T., Walker, R. T., Tanaka, H., Stammers, D. K. y Stuart, D. I. (1996). Complexes of HIV-1 reverse transcriptase with inhibitors of the HEPT series reveal conformational changes relevant to the design of potent non-nucleoside inhibitors. *J Med Chem* **39**, 1589-1600.

Hostomsky, Z., Hostomska, Z., Fu, T. B. y Taylor, J. (1992). Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *J Virol* **66**, 3179-3182.

Hottiger, M. y Hübscher, U. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 97-120.

Hsiou, Y., Das, K., Ding, J., Clark, A. D., Jr., Kleim, J. P., Rosner, M., Winkler, I., Riess, G., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1998). Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBV 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J Mol Biol* **284**, 313-323.

Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A. D., Jr., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1996). Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* **4**, 853-860.

Hsu, M., Inouye, P., Rezende, L., Richard, N., Li, Z., Prasad, V. R. y Wainberg, M. A. (1997). Higher fidelity of RNA-dependent DNA mispair extension by M184V drug-resistant than wild-type reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* **25**, 4532-4536.

Hu, Z., Giguel, F., Hatano, H., Reid, P., Lu, J. y Kuritzkes, D. R. (2006). Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**, 7020-7027.

Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. y Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**, 1669-1675.

Iversen, A. K., Shafer, R. W., Wehrly, K., Winters, M. A., Mullins, J. I., Chesebro, B. y Merigan, T. C. (1996). Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol* **70**, 1086-1090.

Izopet, J., Bicart-See, A., Pasquier, C., Sandres, K., Bonnet, E., Marchou, B., Puel, J. y Massip, P. (1999). Mutations conferring resistance to zidovudine diminish the antiviral effect of stavudine plus didanosine. *J Med Virol* **59**, 507-511.

Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6320-6324.

- Jacques, P. S., Wohrl, B. M., Ottmann, M., Darlix, J. L. y Le Grice, S. F. (1994). Mutating the "primer grip" of p66 HIV-1 reverse transcriptase implicates tryptophan-229 in template-primer utilization. *J Biol Chem* **269**, 26472-26478.
- Johnson, K. A. (1993). Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu Rev Biochem* **62**, 685-713.
- Johnson, V. A., Brun-Vézinet, F., Clotet, B., Gunthard, H. F., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J. M. y Richman, D. D. (2007). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. *Top HIV Med* **15**, 119-125.
- Jonckheere, H., De Clercq, E. y Anne, J. (2000). Fidelity analysis of HIV-1 reverse transcriptase mutants with an altered amino-acid sequence at residues Leu74, Glu89, Tyr115, Tyr183 and Met184. *Eur J Biochem* **267**, 2658-2665.
- Jonckheere, H., Witvrouw, M., De Clercq, E. y Annè, J. (1998). Lamivudine resistance of HIV type 1 does not delay development of resistance to nonnucleoside HIV type 1-specific reverse transcriptase inhibitors as compared with wild-type HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 249-253.
- Jones, K. A. y Peterlin, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**, 717-743.
- Joyce, C. M. y Steitz, T. A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol* **177**, 6321-6329.
- Julias, J. G., Boyer, P. L., McWilliams, M. J., Alvord, W. G. y Hughes, S. H. (2004). Mutations at position 184 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase affect virus titer and viral DNA synthesis. *Virology* **322**, 13-21.
- Kagan, R. M., Lee, T. S., Ross, L., Lloyd, R. M., Jr., Lewinski, M. A. y Potts, S. J. (2007). Molecular basis of antagonism between K70E and K65R tenofovir-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Res* **75**, 210-218.
- Kakuda, T. N. (2000). Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther* **22**, 685-708.
- Kati, W. M., Johnson, K. A., Jerva, L. F. y Anderson, K. S. (1992). Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* **267**, 25988-25997.
- Kaushik, N., Harris, D., Rege, N., Modak, M. J., Yadav, P. N. y Pandey, V. N. (1997). Role of glutamine-151 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in RNA-directed DNA synthesis. *Biochemistry* **36**, 14430-14438.
- Kaushik, N., Rege, N., Yadav, P. N., Sarafianos, S. G., Modak, M. J. y Pandey, V. N. (1996). Biochemical analysis of catalytically crucial aspartate mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **35**, 11536-11546.
- Kaushik, N., Talele, T. T., Pandey, P. K., Harris, D., Yadav, P. N. y Pandey, V. N. (2000). Role of glutamine 151 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in substrate selection as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**, 2912-2920.

Keulen, W., Nijhuis, M., Schuurman, R., Berkhout, B. y Boucher, C. (1997). Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation. *Science* **275**, 229; author reply 230-221.

Kew, Y., Olsen, L. R., Japour, A. J. y Prasad, V. R. (1998). Insertions into the β 3- β 4 hairpin loop of HIV-1 reverse transcriptase reveal a role for fingers subdomain in processive polymerization. *J Biol Chem* **273**, 7529-7537.

Kew, Y., Qingbin, S. y Prasad, V. R. (1994). Subunit-selective mutagenesis of Glu-89 residue in human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Contribution of p66 and p51 subunits to nucleoside analog sensitivity, divalent cation preference, and steady state kinetic properties. *J Biol Chem* **269**, 15331-15336.

Kim, B., Ayran, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H. y Horrigan, J. (1999). New human immunodeficiency virus, type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis. Accuracy, template binding, and processivity. *J Biol Chem* **274**, 27666-27673.

Kim, B., Hathaway, T. R. y Loeb, L. A. (1996). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Functional mutants obtained by random mutagenesis coupled with genetic selection in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**, 4872-4878.

Kim, B., Hathaway, T. R. y Loeb, L. A. (1998). Fidelity of mutant HIV-1 reverse transcriptases: interaction with the single-stranded template influences the accuracy of DNA synthesis. *Biochemistry* **37**, 5831-5839.

Kim, E. Y., Vrang, L., Oberg, B. y Merigan, T. C. (2001). Anti-HIV type 1 activity of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine for several different multidrug-resistant mutants. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 401-407.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. y Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.

Kleim, J. P., Rosner, M., Winkler, I., Paessens, A., Kirsch, R., Hsiou, Y., Arnold, E. y Riess, G. (1996). Selective pressure of a quinoxaline nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on HIV-1 replication results in the emergence of nucleoside RT-inhibitor-specific (RT Leu-74→Val or Ile and Val-75→Leu or Ile) HIV-1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 34-38.

Kohler, J. J. y Lewis, W. (2007). A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen* **48**, 166-172.

Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783-1790.

Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **279**, 16895-16898.

Kunkel, T. A. y Soni, A. (1988). Mutagenesis by transient misalignment. *J Biol Chem* **263**, 14784-14789.

- Lacey, S. F., Reardon, J. E., Furfine, E. S., Kunkel, T. A., Bebenek, K., Eckert, K. A., Kemp, S. D. y Larder, B. A. (1992). Biochemical studies on the reverse transcriptase and RNase H activities from human immunodeficiency virus strains resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J Biol Chem* **267**, 15789-15794.
- Larder, B. A. (1994). Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* **75**, 951-957.
- Larder, B. A., Bloor, S., Kemp, S. D., Hertogs, K., Desmet, R. L., Miller, V., Sturmer, M., Staszewski, S., Ren, J., Stammers, D. K., Stuart, D. I. y Pauwels, R. (1999). A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1961-1967.
- Larder, B. A., Darby, G. y Richman, D. D. (1989a). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**, 1731-1734.
- Larder, B. A. y Kemp, S. D. (1989c). Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* **246**, 1155-1158.
- Larder, B. A., Kemp, S. D. y Purifoy, D. J. (1989b). Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4803-4807.
- Larder, B. A., Purifoy, D. J., Powell, K. L. y Darby, G. (1987). Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* **327**, 716-717.
- Laughlin, M. A. y Pomerantz, R. J. (1994). Cellular latency in HIV-1 infection. *Clin Lab Med* **14**, 239-255.
- Le Grice, S. F., Naas, T., Wohlgensinger, B. y Schatz, O. (1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J* **10**, 3905-3911.
- Lennerstrand, J., Stammers, D. K. y Larder, B. A. (2001). Biochemical mechanism of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistance to stavudine. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2144-2146.
- Lever, A. M. (2007). HIV-1 RNA packaging. *Adv Pharmacol* **55**, 1-32.
- Levy, J. A., Mitra, G. y Mozen, M. M. (1984). Recovery and inactivation of infectious retroviruses from factor VIII concentration. *Lancet* **2**, 722-723.
- Lewis, D. A., Bebenek, K., Beard, W. A., Wilson, S. H. y Kunkel, T. A. (1999). Uniquely altered DNA replication fidelity conferred by an amino acid change in the nucleotide binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **274**, 32924-32930.
- Lewis, W., Day, B. J. y Copeland, W. C. (2003). Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 812-822.

- Lightfoote, M. M., Coligan, J. E., Folks, T. M., Fauci, A. S., Martin, M. A. y Venkatesan, S. (1986). Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *J Virol* **60**, 771-775.
- Lin, P. F., Samanta, H., Rose, R. E., Patick, A. K., Trimble, J., Bechtold, C. M., Revie, D. R., Khan, N. C., Federici, M. E., Li, H., Lee, A., Anderson, R. E. y Colonno, R. J. (1994). Genotypic and phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients on prolonged stavudine therapy. *J Infect Dis* **170**, 1157-1164.
- Lobato, R. L., Kim, E. Y., Kagan, R. M. y Merigan, T. C. (2002). Genotypic and phenotypic analysis of a novel 15-base insertion occurring between codons 69 and 70 of HIV type 1 reverse transcriptase. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 733-736.
- Louis, J. M., Ishima, R., Torchia, D. A. y Weber, I. T. (2007). HIV-1 protease: structure, dynamics, and inhibition. *Adv Pharmacol* **55**, 261-298.
- Lowe, D. M., Parmar, V., Kemp, S. D. y Larder, B. A. (1991). Mutational analysis of two conserved sequence motifs in HIV-1 reverse transcriptase. *FEBS Lett* **282**, 231-234.
- Lukashov, V. V., de Ronde, A., de Jong, J. J. y Goudsmit, J. (2000). Epidemiology of HIV-1 and emerging problems. *Int J Antimicrob Agents* **16**, 463-466.
- Lukashov, V. V., Huismans, R., Jebbink, M. F., Danner, S. A., de Boer, R. J. y Goudsmit, J. (2001). Selection by AZT and rapid replacement in the absence of drugs of HIV type 1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 807-818.
- Mansky, L. M. (1998). Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol* **79**, 1337-1345.
- Mansky, L. M. y Bernard, L. C. (2000). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) and AZT-resistant reverse transcriptase can increase the *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**, 9532-9539.
- Mansky, L. M., Le Rouzic, E., Benichou, S. y Gajary, L. C. (2003). Influence of reverse transcriptase variants, drugs, and Vpr on human immunodeficiency virus type 1 mutant frequencies. *J Virol* **77**, 2071-2080.
- Mansky, L. M. y Temin, H. M. (1995). Lower *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-5094.
- Marcelin, A. G., Delaunay, C., Wirden, M., Viegas, P., Simon, A., Katlama, C. y Calvez, V. (2004). Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol* **72**, 162-165.
- Marchand, B. y Götte, M. (2003). Site-specific footprinting reveals differences in the translocation status of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for polymerase translocation and drug resistance. *J Biol Chem* **278**, 35362-35372.

Marchand, B., Tchesnokov, E. P. y Götte, M. (2007). The pyrophosphate analogue foscarnet traps the pre-translocational state of HIV-1 reverse transcriptase in a Brownian ratchet model of polymerase translocation. *J Biol Chem* **282**, 3337-3346.

Martin, J. L., Wilson, J. E., Haynes, R. L. y Furman, P. A. (1993). Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to 2',3'-dideoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6135-6139.

Martín-Hernández, A. M., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: role of Tyr115 in deoxynucleotide binding and misinsertion fidelity of DNA synthesis. *EMBO J* **15**, 4434-4442.

Martín-Hernández, A. M., Gutiérrez-Rivas, M., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1997). Mismatch extension fidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Tyr115. *Nucleic Acids Res* **25**, 1383-1389.

Mas, A., Parera, M., Briones, C., Soriano, V., Martínez, M. A., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (2000). Role of a dipeptide insertion between codons 69 and 70 of HIV-1 reverse transcriptase in the mechanism of AZT resistance. *EMBO J* **19**, 5752-5761.

Mas, A., Vázquez-Álvarez, B. M., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (2002). Multidrug-resistant HIV-1 reverse transcriptase: involvement of ribonucleotide-dependent phosphorolysis in cross-resistance to nucleoside analogue inhibitors. *J Mol Biol* **323**, 181-197.

Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., Ruffault, A., Mohammed, A. S., Cottalorda, J., Schmuck, A., Calvez, V., Dam, E., Fleury, H. y Brun-Vézinet, F. (2001). Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1836-1842.

Mendelman, L. V., Petruska, J. y Goodman, M. F. (1990). Base mismatch extension kinetics. Comparison of DNA polymerase α and reverse transcriptase. *J Biol Chem* **265**, 2338-2346.

Mendieta, J., Cases-González, C. E., Matamoros, T., Ramirez, G. y Menéndez-Arias, L. (2007). A Mg^{2+} -induced conformational switch rendering a competent DNA polymerase catalytic complex. *Proteins*. In press. (DOI 10.1002/prot.21711).

Menéndez-Arias, L. (2002a). Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 381-388.

Menéndez-Arias, L. (2002b). Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**, 91-147.

Menéndez-Arias, L. y Domingo, E. (2007) Amino acid substitutions associated with resistance to HIV-1 reverse transcriptase, protease inhibitors, and other drugs targeting virus maturation and integration. En *Guide to management of HIV drug resistance, antiretrovirals pharmacokinetics and viral hepatitis in HIV infected subjects, 7th Edition* (ed. por B. Clotet, L. Menéndez-Arias, J. M. Schapiro, D. Kuritzkes, D. Burger, A. Telenti, F. Brun-Vézinet, A. M. Geretti, C. A. Boucher y D. D. Richman), págs. 37-131. Fundació de Lluita contra la SIDA, Barcelona, España.

Menéndez-Arias, L., Matamoros, T. y Cases-González, C. E. (2006). Insertions and deletions in HIV-1 reverse transcriptase: consequences for drug resistance and viral fitness. *Curr Pharm Des* **12**, 1811-1825.

Merta, A., Votruba, I., Jindrich, J., Holý, A., Cihlar, T., Rosenberg, I., Otmar, M. y Herve, T. Y. (1992). Phosphorylation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine and 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine by AMP(dAMP) kinase from L1210 cells. *Biochem Pharmacol* **44**, 2067-2077.

Meyer, P. R., Lennerstrand, J., Matsuura, S. E., Larder, B. A. y Scott, W. A. (2003a). Effects of dipeptide insertions between codons 69 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on primer unblocking, deoxynucleoside triphosphate inhibition, and DNA chain elongation. *J Virol* **77**, 3871-3877.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Mian, A. M., So, A. G. y Scott, W. A. (1999). A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* **4**, 35-43.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Schinazi, R. F., So, A. G. y Scott, W. A. (2000). Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3465-3472.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G. y Scott, W. A. (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13471-13476.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Zonarich, D., Chopra, R. R., Pendarvis, E., Bazmi, H. Z., Mellors, J. W. y Scott, W. A. (2003b). Relationship between 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance and primer unblocking activity in foscarnet-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **77**, 6127-6137.

Meyer, P. R., Rutvisuttinunt, W., Matsuura, S. E., So, A. G. y Scott, W. A. (2007). Stable complexes formed by HIV-1 reverse transcriptase at distinct positions on the primer-template controlled by binding deoxynucleoside triphosphates or foscarnet. *J Mol Biol* **369**, 41-54.

Meyer, P. R., Smith, A. J., Matsuura, S. E. y Scott, W. A. (2004). Effects of primer-template sequence on ATP-dependent removal of chain-terminating nucleotide analogues by HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **279**, 45389-45398.

Meyer, P. R., Smith, A. J., Matsuura, S. E. y Scott, W. A. (2006). Chain-terminating dinucleoside tetraphosphates are substrates for DNA polymerization by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with increased activity against thymidine analogue-resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3607-3614.

Miller, M. D. (2004). K65R, TAMs and tenofovir. *AIDS Rev* **6**, 22-33.

Naeger, L. K., Margot, N. A. y Miller, M. D. (2002). ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2179-2184.

Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R. A., Yao, X. J., Checroune, F., Rougeau, N. y Cohen, E. A. (1998). The putative α helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J Virol* **72**, 4104-4115.

Nikolenko, G. N., Palmer, S., Maldarelli, F., Mellors, J. W., Coffin, J. M. y Pathak, V. K. (2005). Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2093-2098.

Nolan, D. y Mallal, S. (2004). Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antivir Ther* **9**, 849-863.

Olivares, I., Gutiérrez-Rivas, M., López-Galíndez, C. y Menéndez-Arias, L. (2004). Tryptophan scanning mutagenesis of aromatic residues within the polymerase domain of HIV-1 reverse transcriptase: critical role of Phe-130 for p51 function and second-site revertant restoring viral replication capacity. *Virology* **324**, 400-411.

Oude Essink, B. B., Back, N. K. y Berkhout, B. (1997). Increased polymerase fidelity of the 3TC-resistant variants of HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **25**, 3212-3217.

Oude Essink, B. B. y Berkhout, B. (1999). The fidelity of reverse transcription differs in reactions primed with RNA versus DNA primers. *J Biomed Sci* **6**, 121-132.

Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J. y Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**, 853-860.

Pandey, V. N., Kaushik, N., Rege, N., Sarafianos, S. G., Yadav, P. N. y Modak, M. J. (1996). Role of methionine 184 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in the polymerase function and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry* **35**, 2168-2179.

Pelemans, H., Esnouf, R. M., Jonckheere, H., De Clercq, E. y Balzarini, J. (1998). Mutational analysis of Tyr-318 within the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase. *J Biol Chem* **273**, 34234-34239.

Pellegrin, I., Izopet, J., Reynes, J., Denayrolles, M., Montes, B., Pellegrin, J. L., Massip, P., Puel, J., Fleury, H. y Segondy, M. (1999). Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI Group. *AIDS* **13**, 1705-1709.

Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R. y McMichael, A. J. (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**, 453-459.

Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. y Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.

- Prabakaran, P., Dimitrov, A. S., Fouts, T. R. y Dimitrov, D. S. (2007). Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Adv Pharmacol* **55**, 33-97.
- Prado, J. G., Franco, S., Matamoros, T., Ruiz, L., Clotet, B., Menéndez-Arias, L., Martínez, M. A. y Martínez-Picado, J. (2004). Relative replication fitness of multi-nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains bearing a dipeptide insertion in the fingers subdomain of the reverse transcriptase and mutations at codons 67 and 215. *Virology* **326**, 103-112.
- Preston, B. D. (1997). Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation. *Science* **275**, 228-229; author reply 230-221.
- Preston, B. D. y Dougherty, J. P. (1996). Mechanisms of retroviral mutation. *Trends Microbiol* **4**, 16-21.
- Preston, B. D., Poiesz, B. J. y Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**, 1168-1171.
- Quiñones-Mateu, M. E., Soriano, V., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (1997). Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate. *Virology* **236**, 364-373.
- Quiñones-Mateu, M. E., Tadele, M., Parera, M., Mas, A., Weber, J., Rangel, H. R., Chakraborty, B., Clotet, B., Domingo, E., Menéndez-Arias, L. y Martínez, M. A. (2002). Insertions in the reverse transcriptase increase both drug resistance and viral fitness in a human immunodeficiency virus type 1 isolate harboring the multi-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance 69 insertion complex mutation. *J Virol* **76**, 10546-10552.
- Quivy, V., De Walque, S. y Van Lint, C. (2007). Chromatin-associated regulation of HIV-1 transcription: implications for the development of therapeutic strategies. *Subcell Biochem* **41**, 371-396.
- Rakik, A., Ait-Khaled, M., Griffin, P., Thomas, T. A., Tisdale, M. y Kleim, J. P. (1999). A novel genotype encoding a single amino acid insertion and five other substitutions between residues 64 and 74 of the HIV-1 reverse transcriptase confers high-level cross-resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Abacavir CNA2007 International Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* **22**, 139-145.
- Ray, A. S., Basavapathruni, A. y Anderson, K. S. (2002a). Mechanistic studies to understand the progressive development of resistance in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to abacavir. *J Biol Chem* **277**, 40479-40490.
- Ray, A. S., Murakami, E., Basavapathruni, A., Vaccaro, J. A., Ulrich, D., Chu, C. K., Schinazi, R. F. y Anderson, K. S. (2003). Probing the molecular mechanisms of AZT drug resistance mediated by HIV-1 reverse transcriptase using a transient kinetic analysis. *Biochemistry* **42**, 8831-8841.
- Ray, A. S., Murakami, E., Peterson, C. N., Shi, J., Schinazi, R. F. y Anderson, K. S. (2002b). Interactions of enantiomers of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-fluorocytidine with wild type and M184V mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Res* **56**, 189-205.

- Ren, J., Diprose, J., Warren, J., Esnouf, R. M., Bird, L. E., Ikemizu, S., Slater, M., Milton, J., Balzarini, J., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2000). Phenylethylthiazolylthiourea (PETT) non-nucleoside inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. Structural and biochemical analyses. *J Biol Chem* **275**, 5633-5639.
- Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D. y Stammers, D. K. (1995). High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol* **2**, 293-302.
- Ren, J., Esnouf, R., Hopkins, A., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. y Stuart, D. (1995). The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design. *Structure* **3**, 915-926.
- Ren, J., Esnouf, R. M., Hopkins, A. L., Jones, E. Y., Kirby, I., Keeling, J., Ross, C. K., Larder, B. A., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (1998). 3'-Azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9518-9523.
- Ren, J., Esnouf, R. M., Hopkins, A. L., Warren, J., Balzarini, J., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (1998). Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase in complex with carboxanilide derivatives. *Biochemistry* **37**, 14394-14403.
- Rezende, L. F., Curr, K., Ueno, T., Mitsuya, H. y Prasad, V. R. (1998). The impact of multidideoxynucleoside resistance-conferring mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on polymerase fidelity and error specificity. *J Virol* **72**, 2890-2895.
- Rezende, L. F., Drosopoulos, W. C. y Prasad, V. R. (1998). The influence of 3TC resistance mutation M184I on the fidelity and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* **26**, 3066-3072.
- Rezende, L. F. y Prasad, V. R. (2004). Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1716-1734.
- Richman, D. D. (1993). Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1207-1213.
- Rigourd, M., Ehresmann, C., Parniak, M. A., Ehresmann, B. y Marquet, R. (2002). Primer unblocking and rescue of DNA synthesis by azidothymidine (AZT)-resistant HIV-1 reverse transcriptase: comparison between initiation and elongation of reverse transcription and between (-) and (+) strand DNA synthesis. *J Biol Chem* **277**, 18611-18618.
- Roberts, J. D., Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171-1173.
- Rodgers, D. W., Gamblin, S. J., Harris, B. A., Ray, S., Culp, J. S., Hellmig, B., Woolf, D. J., Debouck, C. y Harrison, S. C. (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1222-1226.

Ross, L., Johnson, M., Graham, N., Shaefer, M. y St Clair, M. (1999). The reverse transcriptase codon 69 insertion is observed in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected individuals, including those without prior or concurrent zidovudine therapy. *J Hum Virol* **2**, 290-295.

Rousseau, M. N., Vergne, L., Montes, B., Peeters, M., Reynes, J., Delaporte, E. y Segondy, M. (2001). Patterns of resistance mutations to antiretroviral drugs in extensively treated HIV-1-infected patients with failure of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**, 36-43.

Rubinek, T., Bakhanashvili, M., Taube, R., Avidan, O. y Hizi, A. (1997). The fidelity of 3' misinsertion and mispair extension during DNA synthesis exhibited by two drug-resistant mutants of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 with Leu74→Val and Glu89→Gly. *Eur J Biochem* **247**, 238-247.

Rucker, E., Grivel, J. C., Munch, J., Kirchhoff, F. y Margolis, L. (2004). Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue *ex vivo*. *J Virol* **78**, 12689-12693.

Sabbioni, E., Blanch, N., Baricevic, K. y A., S. M. (1999). Effects of trace metal compounds on HIV-1 reverse transcriptase. An *in vitro* study. *Biol Trace Elem Res* **68**, 107-119.

Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumaran, P., Ramesha, A. R., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2002). Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J* **21**, 6614-6624.

Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Tuske, S., Squire, C. J., Das, K., Sheng, D., Ilankumaran, P., Ramesha, A. R., Kroth, H., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2003). Trapping HIV-1 reverse transcriptase before and after translocation on DNA. *J Biol Chem* **278**, 16280-16288.

Sarafianos, S. G., Das, K., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1999). Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with β -branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10027-10032.

Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2001). Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J* **20**, 1449-1461.

Sarafianos, S. G., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2004). Designing anti-AIDS drugs targeting the major mechanism of HIV-1 RT resistance to nucleoside analog drugs. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1706-1715.

Sarafianos, S. G., Pandey, V. N., Kaushik, N. y Modak, M. J. (1995). Site-directed mutagenesis of arginine 72 of HIV-1 reverse transcriptase. Catalytic role and inhibitor sensitivity. *J Biol Chem* **270**, 19729-19735.

Sarafianos, S. G., Pandey, V. N., Kaushik, N. y Modak, M. J. (1995). Glutamine 151 participates in the substrate dNTP binding function of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **34**, 7207-7216.

- Sardana, V. V., Emini, E. A., Gotlib, L., Graham, D. J., Lineberger, D. W., Long, W. J., Schlabach, A. J., Wolfgang, J. A. y Condra, J. H. (1992). Functional analysis of HIV-1 reverse transcriptase amino acids involved in resistance to multiple nonnucleoside inhibitors. *J Biol Chem* **267**, 17526-17530.
- Sato, H., Tomita, Y., Ebisawa, K., Hachiya, A., Shibamura, K., Shiino, T., Yang, R., Tatsumi, M., Gushi, K., Umeyama, H., Oka, S., Takebe, Y. y Nagai, Y. (2001). Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 subtype E (CRF01_AE) multiple-drug resistance by insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. *J Virol* **75**, 5604-5613.
- Schinazi, R. F., Hernández-Santiago, B. I. y Hurwitz, S. J. (2006). Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses. *Antiviral Res* **71**, 322-334.
- Schneider, B., Meyer, P., Sarfati, S., Mulard, L., Guerreiro, C., Boretto, J., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D. y Canard, B. (2001). Activation of anti-reverse transcriptase nucleotide analogs by nucleoside diphosphate kinase: improvement by α -boranophosphate substitution. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **20**, 297-306.
- Schneider, V., Legoff, J., Belec, L., Delphin, N., Dutreuil, C., Kara-Mostefa, A., Rozenbaum, W. y Nicolas, J. C. (2004). Peptide insertions in reverse transcriptase *pol* gene of human immunodeficiency virus type 1 as a rare cause of persistent antiretroviral therapeutic failure. *Clin Microbiol Infect* **10**, 127-136.
- Selmi, B., Boretto, J., Navarro, J. M., Sire, J., Longhi, S., Guerreiro, C., Mulard, L., Sarfati, S. y Canard, B. (2001a). The valine-to-threonine 75 substitution in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its relation with stavudine resistance. *J Biol Chem* **276**, 13965-13974.
- Selmi, B., Boretto, J., Sarfati, S. R., Guerreiro, C. y Canard, B. (2001b). Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an α -boranophosphate nucleoside analogue. *J Biol Chem* **276**, 48466-48472.
- Selmi, B., Deval, J., Alvarez, K., Boretto, J., Sarfati, S., Guerreiro, C. y Canard, B. (2003). The Y181C substitution in 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant human immunodeficiency virus, type 1, reverse transcriptase suppresses the ATP-mediated repair of the 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-monophosphate-terminated primer. *J Biol Chem* **278**, 40464-40472.
- Shah, F. S., Curr, K. A., Hamburgh, M. E., Parniak, M., Mitsuya, H., Arnez, J. G. y Prasad, V. R. (2000). Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* **275**, 27037-27044.
- Sharma, B., Kaushik, N., Singh, K., Kumar, S. y Pandey, V. N. (2002). Substitution of conserved hydrophobic residues in motifs B and C of HIV-1 RT alters the geometry of its catalytic pocket. *Biochemistry* **41**, 15685-15697.
- Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A. y Crabtree, G. R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205.
- Shih, C. K., Rose, J. M., Hansen, G. L., Wu, J. C., Bacolla, A. y Griffin, J. A. (1991). Chimeric human immunodeficiency virus type 1/type 2 reverse transcriptases display reversed sensitivity to nonnucleoside analog inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9878-9882.

Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Choekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., Yarchoan, R. y et al. (1995). Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2398-2402.

Sirover, M. A. y Loeb, L. A. (1976). Metal-induced infidelity during DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2331-2335.

Sluis-Cremer, N., Arion, D., Kaushik, N., Lim, H. y Parniak, M. A. (2000). Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J* **348**, 77-82.

Sluis-Cremer, N., Sheen, C. W., Zelina, S., Torres, P. S., Parikh, U. M. y Mellors, J. W. (2007). Molecular mechanism by which the K70E mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 48-53.

Smerdon, S. J., Jager, J., Wang, J., Kohlstaedt, L. A., Chirino, A. J., Friedman, J. M., Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1994). Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3911-3915.

Smith, A. J., Meyer, P. R., Asthana, D., Ashman, M. R. y Scott, W. A. (2005). Intracellular substrates for the primer-unblocking reaction by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: detection and quantitation in extracts from quiescent- and activated-lymphocyte subpopulations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1761-1769.

Smith, A. J. y Scott, W. A. (2006). The influence of natural substrates and inhibitors on the nucleotide-dependent excision activity of HIV-1 reverse transcriptase in the infected cell. *Curr Pharm Des* **12**, 1827-1841.

Snow, E. T., Xu, L. S. y Kinney, P. L. (1993). Effects of nickel ions on polymerase activity and fidelity during DNA replication *in vitro*. *Chem Biol Interact* **88**, 155-173.

Sousa, R. (1996). Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *Trends Biochem Sci* **21**, 186-190.

Spence, R. A., Anderson, K. S. y Johnson, K. A. (1996). HIV-1 reverse transcriptase resistance to nonnucleoside inhibitors. *Biochemistry* **35**, 1054-1063.

Sugiura, W., Matsuda, M., Matsuda, Z., Abumi, H., Okano, A., Oishi, T., Moriya, K., Yamamoto, Y., Fukutake, K., Mimaya, J., Ajisawa, A., Taki, M., Yamada, K. y Nagai, Y. (1999). Identification of insertion mutations in HIV-1 reverse transcriptase causing multiple drug resistance to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *J Hum Virol* **2**, 146-153.

Summers, J. S., Roe, D., Boyle, P. D., Colvin, M. y Shaw, B. R. (1998). Structural studies of a borane-modified phosphate diester linkage: *Ab Initio* calculations on the dimethylboranophosphate anion and the single-crystal X-ray structure of its diisopropylammonium salt. *Inorg Chem* **37**, 4158-4159.

Summers, J. S. y Shaw, B. R. (2001). Boranophosphates as mimics of natural phosphodiester in DNA. *Curr Med Chem* **8**, 1147-1155.

Svarovskaia, E. S., Cheslock, S. R., Zhang, W. H., Hu, W. S. y Pathak, V. K. (2003). Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. *Front Biosci* **8**, d117-134.

Svicher, V., Sing, T., Santoro, M. M., Forbici, F., Rodriguez-Barrios, F., Bertoli, A., Beerenwinkel, N., Bellocchi, M. C., Gago, F., d'Arminio Monforte, A., Antinori, A., Lengauer, T., Ceccherini-Silberstein, F. y Perno, C. F. (2006). Involvement of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors. *J Virol* **80**, 7186-7198.

Tachedjian, G., Mellors, J., Bazmi, H., Birch, C. y Mills, J. (1996). Zidovudine resistance is suppressed by mutations conferring resistance of human immunodeficiency virus type 1 to foscarnet. *J Virol* **70**, 7171-7181.

Tamalet, C., Henry, M., Colson, P., Yah, N., Poggi, C. y Lefeuvre, A. (2004). Uncommon association of T69 3-base-pair insertion plus Q151M multidrug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4493-4494.

Tamalet, C., Izopet, J., Koch, N., Fantini, J. y Yah, N. (1998). Stable rearrangements of the β 3- β 4 hairpin loop of HIV-1 reverse transcriptase in plasma viruses from patients receiving combination therapy. *AIDS* **12**, F161-166.

Tamalet, C., Yah, N., Tourres, C., Colson, P., Quinson, A. M., Poizot-Martin, I., Dhiver, C. y Fantini, J. (2000). Multidrug resistance genotypes (insertions in the β 3- β 4 finger subdomain and MDR mutations) of HIV-1 reverse transcriptase from extensively treated patients: incidence and association with other resistance mutations. *Virology* **270**, 310-316.

Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R. G., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P. A. y Arnold, E. (1994). Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol* **243**, 369-387.

Telesnitsky, A. y Goff, S. P. (1997). Reverse Transcriptase and the generation of retroviral DNA. En *Retroviruses* (editado por Coffin, J. M., Hughes, S. H. y Varmus, H.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York, págs. 121-160.

Temin, H. M. y Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213.

Tong, W., Lu, C. D., Sharma, S. K., Matsuura, S., So, A. G. y Scott, W. A. (1997). Nucleotide-induced stable complex formation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **36**, 5749-5757.

Turner, B. G. y Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32.

Tuske, S., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Naeger, L. K., White, K. L., Miller, M. D., Gibbs, C. S., Boyer, P. L., Clark, P., Wang, G., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Jerina, D. M., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2004). Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 469-474.

Ueno, T. y Mitsuya, H. (1997). Comparative enzymatic study of HIV-1 reverse transcriptase resistant to 2',3'-dideoxynucleotide analogs using the single-nucleotide incorporation assay. *Biochemistry* **36**, 1092-1099.

- Ueno, T., Shirasaka, T. y Mitsuya, H. (1995). Enzymatic characterization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistant to multiple 2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates. *J Biol Chem* **270**, 23605-23611.
- Van der Hoek, L., Back, N., Jebbink, M. F., de Ronde, A., Bakker, M., Jurriaans, S., Reiss, P., Parkin, N. y Berkhout, B. (2005). Increased multinucleoside drug resistance and decreased replicative capacity of a human immunodeficiency virus type 1 variant with an 8-amino-acid insert in the reverse transcriptase. *J Virol* **79**, 3536-3543.
- Van Vaerenbergh, K., Van Laethem, K., Albert, J., Boucher, C. A., Clotet, B., Florida, M., Gerstoft, J., Hejdeman, B., Nielsen, C., Pannecouque, C., Perrin, L., Pirillo, M. F., Ruiz, L., Schmit, J. C., Schneider, F., Schoolmeester, A., Schuurman, R., Stellbrink, H. J., Stuyver, L., Van Lunzen, J., Van Remoortel, B., Van Wijngaerden, E., Vella, S., Witvrouw, M., Yerly, S., De Clercq, E., Destmyer, J. y Vandamme, A. M. (2000). Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2109-2117.
- Vartanian, J. P., Plikat, U., Henry, M., Mahieux, R., Guillemot, L., Meyerhans, A. y Wain-Hobson, S. (1997). HIV genetic variation is directed and restricted by DNA precursor availability. *J Mol Biol* **270**, 139-151.
- Verma, S. y Eckstein, F. (1998). Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu Rev Biochem* **67**, 99-134.
- Wainberg, M. A., Cahn, P., Bethell, R. C., Sawyer, J. y Cox, S. (2007). Apricitabine: a novel deoxycytidine analogue nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of nucleoside-resistant HIV infection. *Antivir Chem Chemother* **18**, 61-70.
- Wainberg, M. A., Drosopoulos, W. C., Salomon, H., Hsu, M., Borkow, G., Parniak, M., Gu, Z., Song, Q., Manne, J., Islam, S., Castriota, G. y Prasad, V. R. (1996). Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **271**, 1282-1285.
- Wakefield, J. K., Jablonski, S. A. y Morrow, C. D. (1992). *In vitro* enzymatic activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants in the highly conserved YMDD amino acid motif correlates with the infectious potential of the proviral genome. *J Virol* **66**, 6806-6812.
- Wang, J., Jin, Y., Rapp, K. L., Schinazi, R. F. y Chu, C. K. (2007). D- and L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-3'-fluoro-carbocyclic nucleosides: synthesis, anti-HIV activity and mechanism of resistance. *J Med Chem* **50**, 1828-1839.
- Wang, J., Smerdon, S. J., Jager, J., Kohlstaedt, L. A., Rice, P. A., Friedman, J. M. y Steitz, T. A. (1994). Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7242-7246.
- Weber, J. y Grosse, F. (1989). Fidelity of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase in copying natural DNA. *Nucleic Acids Res* **17**, 1379-1393.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Saag, M. S. y Shaw, G. M. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**, 117-122.

- Weiss, K. K., Bambara, R. A. y Kim, B. (2002). Mechanistic role of residue Gln151 in error prone DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT). Pre-steady state kinetic study of the Q151N HIV-1 RT mutant with increased fidelity. *J Biol Chem* **277**, 22662-22669.
- Weiss, K. K., Chen, R., Skasko, M., Reynolds, H. M., Lee, K., Bambara, R. A., Mansky, L. M. y Kim, B. (2004). A role for dNTP binding of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in viral mutagenesis. *Biochemistry* **43**, 4490-4500.
- Weiss, K. K., Isaacs, S. J., Tran, N. H., Adman, E. T. y Kim, B. (2000). Molecular architecture of the mutagenic active site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: roles of the β 8- α E loop in fidelity, processivity, and substrate interactions. *Biochemistry* **39**, 10684-10694.
- White, K. L., Chen, J. M., Feng, J. Y., Margot, N. A., Ly, J. K., Ray, A. S., Macarthur, H. L., McDermott, M. J., Swaminathan, S. y Miller, M. D. (2006). The K65R reverse transcriptase mutation in HIV-1 reverses the excision phenotype of zidovudine resistance mutations. *Antivir Ther* **11**, 155-163.
- White, K. L., Chen, J. M., Margot, N. A., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Naeger, L. K., Swaminathan, S. y Miller, M. D. (2004). Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a diserine insertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 992-1003.
- Willis, S. H., Kazmierczak, K. M., Carter, R. H. y Rothman-Denes, L. B. (2002). N4 RNA polymerase II, a heterodimeric RNA polymerase with homology to the single-subunit family of RNA polymerases. *J Bacteriol* **184**, 4952-4961.
- Wilson, J. E., Aulabaugh, A., Caligan, B., McPherson, S., Wakefield, J. K., Jablonski, S., Morrow, C. D., Reardon, J. E. y Furman, P. A. (1996). Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. Contribution of Met-184 to binding of nucleoside 5'-triphosphate. *J Biol Chem* **271**, 13656-13662.
- Wilson, W., Braddock, M., Adams, S. E., Rathjen, P. D., Kingsman, S. M. y Kingsman, A. J. (1988). HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* **55**, 1159-1169.
- Winters, M. A., Coolley, K. L., Girard, Y. A., Levee, D. J., Hamdan, H., Shafer, R. W., Katzenstein, D. A. y Merigan, T. C. (1998). A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* **102**, 1769-1775.
- Winters, M. A., Kagan, R. M., Kovari, L., Heseltine, P. N. y Merigan, T. C. (2005). Rare one and two amino acid inserts adjacent to codon 103 of the HIV-1 reverse transcriptase (RT) affect susceptibility to non-nucleoside RT inhibitors. *Antivir Ther* **10**, 363-366.
- Winters, M. A. y Merigan, T. C. (2005). Insertions in the human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase genes: clinical impact and molecular mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2575-2582.
- Wisniewski, M., Palaniappan, C., Fu, Z., Le Grice, S. F., Fay, P. y Bambara, R. A. (1999). Mutations in the primer grip region of HIV reverse transcriptase can increase replication fidelity. *J Biol Chem* **274**, 28175-28184.

- Wohrl, B. M., Krebs, R., Thrall, S. H., Le Grice, S. F., Scheidig, A. J. y Goody, R. S. (1997). Kinetic analysis of four HIV-1 reverse transcriptase enzymes mutated in the primer grip region of p66. Implications for DNA synthesis and dimerization. *J Biol Chem* **272**, 17581-17587.
- Wrobel, J. A., Chao, S. F., Conrad, M. J., Merker, J. D., Swanstrom, R., Pielak, G. J. y Hutchison, C. A., 3rd. (1998). A genetic approach for identifying critical residues in the fingers and palm subdomains of HIV-1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 638-645.
- Yahi, N., Tamalet, C., Tourres, C., Tivoli, N., Ariasi, F., Volot, F., Gastaut, J. A., Gallais, H., Moreau, J. y Fantini, J. (1999). Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences. *J Clin Microbiol* **37**, 4099-4106.
- Yahi, N., Tourres, C., Tivoli, N., Colson, P., Dhiver, C., Quinson, A. M. y Tamalet, C. (2000). Evolution of HIV-1 multidrug-resistant genotypes during combination therapy and after the cessation of antiretroviral drugs. *AIDS* **14**, 2943-2945.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yerly, S., Rakik, A., De Loes, S. K., Hirschel, B., Descamps, D., Brun-Vézinet, F. y Perrin, L. (1998). Switch to unusual amino acids at codon 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene in seroconvertors infected with zidovudine-resistant variants. *J Virol* **72**, 3520-3523.
- Zhao, R. Y., Elder, R. T. y Bukrinsky, M. (2007). Interactions of HIV-1 viral protein R with host cell proteins. *Adv Pharmacol* **55**, 233-260.
- Zinnen, S., Hsieh, J. C. y Modrich, P. (1994). Misincorporation and mispaired primer extension by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biol Chem* **269**, 24195-24202.

8. Publicaciones

Molecular Determinants of Multi-nucleoside Analogue Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptases Containing a Dipeptide Insertion in the Fingers Subdomain

EFFECT OF MUTATIONS D67N AND T215Y ON REMOVAL OF THYMIDINE NUCLEOTIDE ANALOGUES FROM BLOCKED DNA PRIMERS*[S]

Received for publication, November 19, 2003, and in revised form, March 17, 2004
Published, JBC Papers in Press, March 25, 2004, DOI 10.1074/jbc.M312658200

Tania Matamoros‡, Sandra Franco§, Blanca M. Vázquez-Álvarez‡, Antonio Mas‡¶, Miguel Ángel Martínez§, and Luis Menéndez-Arias‡||

From the ‡Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain and the §Laboratori de Retrovirologia, Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, 08916 Barcelona, Spain

Human immunodeficiency virus type 1 isolates having dipeptide insertions in the fingers subdomain of the reverse transcriptase (RT) show high level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) and other nucleoside analogues. Insertions are usually associated with thymidine analogue resistance mutations, such as T215Y. The resistance phenotype correlates with increased ATP-dependent phosphorolytic activity, which facilitates removal of thymidine analogues from inhibitor-terminated primers. In this report, we show that substituting Thr, Ser, or Asn for Tyr-215 in a multidrug-resistant RT, bearing a Ser-Ser insertion between codons 69 and 70, leads to AZT and stavudine resensitization through the loss of the ATP-mediated removal activity. The mutation D67N, which is rarely found in insertion-containing strains, had no effect on excision and a minor influence on resistance. Substituting Tyr-215 had a larger effect than deleting the dipeptide insertion. The presence of both the insertion and mutation T215Y in the wild-type BH10 RT conferred significant ATP-mediated removal activity and moderate resistance to AZT. However, resistance levels and unblocking activities were lower than those observed with the multidrug-resistant enzyme. Removal reactions can be inhibited by the next complementary dNTP. Both Tyr-215 and the dipeptide insertion affect RT-DNA-DNA-dNTP ternary complex formation, an effect that was not detected in the presence of foscarnet. Based on crystal structures of binary and ternary complexes of HIV-1 RT, we propose that Tyr-215 exerts its action by facilitating a proper orientation of the pyrophosphate donor molecule, whereas the effects on dNTP binding are indirect and could be related to significant conformational changes occurring during polymerization.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)¹ reverse transcriptase (RT) replicates the viral genomic RNA to synthesize a double-stranded DNA that integrates into the host genome. The viral enzyme is multifunctional, possessing RNA- and DNA-dependent DNA polymerase, RNase H, strand transfer, and strand displacement activities (1). HIV-1 RT is a heterodimeric enzyme composed of two polypeptide chains of 66 and 51 kDa, with subdomains termed fingers, thumb, palm, and connection in both subunits and an RNase H domain in the larger subunit only.

HIV-1 RT is an important target for chemotherapeutic intervention in the control of AIDS. Antiretroviral drugs targeting the viral polymerase include nucleoside analogue inhibitors (NRTIs), acyclic nucleoside phosphonates, and non-nucleoside RT inhibitors (NNRTIs) (reviewed in Ref. 2). Inside the cell, nucleoside derivatives are converted to their active triphosphate forms by host cell kinases and are then incorporated into the HIV-1 genome by the viral RT. Because nucleoside analogues lack a 3'-OH group, their incorporation blocks elongation of the growing DNA chain. On the other hand, NNRTIs bind to an allosteric site located 10–15 Å away from the polymerase active site, distorting the geometry and/or the mobility of the polymerase catalytic site, interfering with the proper positioning of the template-primer in the nucleic acid-binding cleft of the RT or restricting the mobility of the thumb, which results in the impairment of translocation during polymerization (for reviews, see Refs. 3 and 4). Although NNRTIs resistance mutations exert their action by diminishing the ability of the enzyme to bind the inhibitor (*i.e.* Y181C for nevirapine, K103N for nevirapine, delavirdine, and efavirenz, etc.), NRTI resistance mutations act either by (i) increasing discrimination against the triphosphate forms of the drugs (reviewed in Refs. 5 and 6) or (ii) increasing the ability of RT to unblock inhibitor-terminated DNA chains in the presence of physiological concentrations of pyrophosphate (PPi) or ATP (7–9).

Mutations such as M184V or M184I, which confer resistance to 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC; lamivudine) are examples of the first mechanism (10). On the other hand, RTs har-

* This work was supported in part by FIPSE Grant 36207/01, Fondo de Investigación Sanitaria Grants 01/0067-01, 01/0067-02, and G03/173 (“Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA”), and an institutional grant from Fundación Ramón Areces. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains a supplemental table.

¶ Present address: Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, 08002 Barcelona, Spain.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-914978477; Fax: 34-914974799; E-mail: lmendez@cbm.uam.es.

¹ The abbreviations used are: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; RT, reverse transcriptase; NRTI, nucleoside analogue RT inhibitor; NNRTI, non-nucleoside RT inhibitor; PPi, pyrophosphate; 3TC, 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine; AZT, 3'-azido-3'-deoxythymidine; d4T, 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine; ddC, 2',3'-dideoxycytidine; ddI, 2',3'-dideoxyinosine; TAM, thymidine analogue resistance mutation.

boring the 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT; zidovudine)-associated mutations D67N and K70R in the fingers subdomain, together with the substitution T215Y, displayed an increased ATP-dependent phosphorolytic activity that facilitates the efficient removal of AZT and 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine (d4T; stavudine) from blocked DNA chains (11). Despite being detectable, the excision reaction appears to be much less efficient with other clinically relevant nucleosides, such as 2',3'-dideoxycytidine (ddC; zalcitabine), abacavir, 3TC, 2',3'-dideoxyinosine (ddI; didanosine), and tenofovir (12–15).

Prolonged use of antiretroviral drugs in the clinical treatment of HIV-infected patients has resulted in the emergence of viral isolates with reduced susceptibilities to multiple RT inhibitors. Among multidrug-resistant viruses, resistance to multiple NRTIs can be achieved by three different major pathways: (i) accumulation of thymidine analogue resistance mutations (TAMs), (*i.e.* M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, and K219Q/E), which have a clinical impact on AZT, d4T, ddI, abacavir, and tenofovir resistance (16–21); (ii) selection of mutation Q151M, followed by other substitutions (A62V, V75I, F77L, and F116Y) that render viruses with significant resistance to AZT, d4T, ddI, ddC, and abacavir (22–24); and (iii) emergence of insertions of two residues (often Ser-Ser, Ser-Gly, and Ser-Ala) together with mutation T69S, in virus containing additional amino acid substitutions associated with NRTI resistance, such as M41L, L210W, and/or T215Y. In phenotypic assays, these viruses display high level resistance to AZT and moderate levels of resistance to other NRTIs, such as d4T, ddC, and ddI (25–28).

Although the biochemical properties of the wild-type HIV-1_{BH10} RT were not significantly altered upon introduction of a dipeptide (Ser-Ser) insertion, we have previously shown that eliminating the insertion in the sequence context of an HIV-1 RT bearing the drug-related mutations M41L, A62V, K70R, V118I, M184I, L210W, T215Y, and G333E produced a significant reduction of the ATP-dependent phosphorolytic activity that allows excision of AZT or d4T from inhibitor-terminated primers (13, 27). These data correlated with a significant reduction in the viral susceptibility to AZT (27). However, eliminating the insertion was not sufficient to abrogate AZT resistance, because of the presence of TAMs in the insertion-containing viral isolate. In this work, we have analyzed the impact of TAMs D67N and T215Y on the ATP- and PPI-mediated removal of AZT- and d4T-monophosphate by SS RT. These two mutations were chosen based on available genotypic data showing that T215Y/F is the most frequently found mutation in viral isolates containing insertions in the fingers subdomain, whereas D67N appears very rarely in those viral strains, despite being a commonly selected mutation during treatment with thymidine analogues.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

RTs—Expression and purification of wild-type BH10, SS, and mutant SS_2S0S were done as previously described (27). Other mutant RTs were generated by using the QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene), following the manufacturer's instructions. Individual mutations Y215T, Y215N, Y215S, and D67N were introduced in plasmid pRT6 carrying the nucleotide sequence encoding the 66-kDa subunit of SS RT (27) to generate mutant enzymes designated as SS_Y215T, SS_Y215N, SS_Y215S, and SS_D67N, respectively (see Fig. 1). On the other hand, the mutation T215Y was introduced in a pRT6 construct encoding a mutated p66 subunit of BH10 RT, which contained the T69SSS insertion (27). This double mutant T69SSS/T215Y was designated as BH10_SSSY. The mutagenic primers used were: 5'-GGAGGTGGGGATTACACACCAGACAAA-3' and 5'-TTTGTCTGGGTGGGTAATCCCCACCT-3' for SS_Y215T; 5'-GGAGGTGGGGATTACACACCAGACAAA-3' and 5'-TTTGTCTGGGTGGGTAATCCCCACCT-3' for SS_Y215S; 5'-GGAGGTGGGGATTACACACCAGACAAA-3' and 5'-TTTGTCTGGGTGGGTAATCCCCACCT-3' for SS_Y215N;

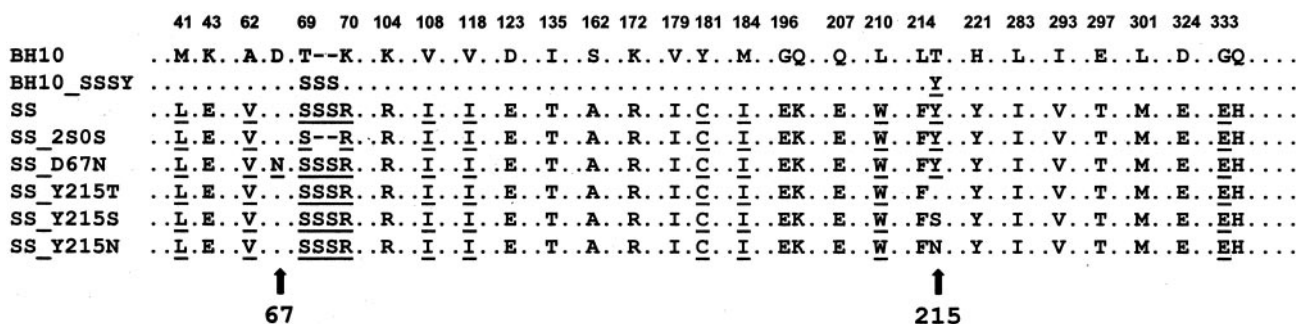
5'-GTCATAAAGAAAAAATAGTTCTAGTTCTAGATGGAG-3' and 5'-CTAGAACTAGAACTATTTTTTTCTTTATG-3' for SS_D67N; and 5'-GAGGTGGGGACTTTACACACCAGACAAAAACATC-3' and 5'-GATGTTTTTTGTCTGGTGTGTAAAGTCCCCACCTC-3' for BH10_SSSY. The introduced mutations were confirmed by DNA sequencing, and the appropriate MscI-KpnI inserts were then cloned in plasmids derived from pT51H (27, 29), for expression of the p51 subunits of SS or BH10 RTs. All of the RTs were purified as p66/p51 heterodimers, and the mutations were introduced in both subunits of the enzyme. The 51-kDa polypeptide was obtained with an extension of 14 amino acids at its N-terminal end, which includes 6 consecutive histidine residues to facilitate its purification by metal chelate affinity chromatography, as previously described (29).

Nucleotides and Template-Primers—The triphosphate derivatives of NRTIs were obtained from Moravex Biochemicals (AZT-triphosphate) and Sierra Bioresearch (d4T-triphosphate). Stock solutions of dNTPs and rNTPs (100 mM) were from Amersham Biosciences. Before use, nucleoside triphosphates were treated with inorganic pyrophosphatase to remove traces of PPI, as described (13). As in previous studies, we used the following heteropolymeric oligonucleotides (Invitrogen) as DNA-DNA template-primer substrates: 5'-GGGTCCTTTCTTACCTGCAAGAATGTATAGCCCTACCA-3' (termed D38) served as DNA template, and 5'-TGGTAGGGCTATACATTCTGCAGG-3' (termed 25PGA) was used as the primer strand. Polyacrylamide gel-purified oligonucleotides were labeled at their 5'-termini with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase (Promega). The phosphorylated primers were then annealed to gel-purified templates in a solution containing 150 mM NaCl and 150 mM magnesium acetate, as described (30). The template-primer molar ratio was adjusted to 1:1.

Chain Terminator Removal Assays—RT-catalyzed DNA rescue reactions were performed with D38/25PGA DNA duplexes as previously described (13). Briefly, the phosphorylated template-primer (30 nM) was preincubated at 37 °C for 10 min in the presence of the corresponding RT at 15–20 nM active enzyme concentration, in 50 mM Hepes buffer (pH 7.0), containing 15 mM NaCl, 15 mM magnesium acetate, 130 mM potassium acetate, 1 mM dithiothreitol, and 5% (w/v) polyethylene glycol 6000. The reactions were initiated by adding an equal amount of preincubation buffer containing AZT-triphosphate or d4T-triphosphate at a final concentration of 25 μ M. After incubating the samples at 37 °C for 30 min, the rescue reactions were initiated by adding a mixture of all dNTPs at a final concentration of 100 μ M, in the presence of sodium PPI (200 μ M) or ATP (3.2 mM) depending on the assay. Because the next complementary dNTP (dATP, in our assay conditions) has an inhibitory effect on the rescue reaction, time courses of the unblocking and extension reactions were carried out in the presence of 1 μ M dATP. Sodium foscarnet (Sigma) inhibition was monitored under these conditions by adding the inhibitor (at 0 to 800 μ M), together with the mixture of dNTPs. In experiments designed to assess the inhibitory effect of dATP, the extension reactions were incubated for 0–15 min in the presence of different concentrations of dATP. In all cases, the incubation times were within the linear range of the corresponding time course. The reactions were stopped by adding an equal amount of 10 mM EDTA in 90% formamide containing 3 mg/ml xylene cyanol FF and 3 mg/ml bromophenol blue. The products were resolved on a denaturing 20% polyacrylamide-urea gel, and primer rescue was quantified by phosphorimaging with a Bas 1500 scanner (Fuji), using the program Tina version 2.09 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Staubenhardt, Germany).

Template-Primer Binding Affinity—Dissociation constants (K_d) of RT-DNA-DNA complexes were determined in accordance with the procedure described by Astatke *et al.* (31). For these experiments, primer 25PGA was blocked at its 3' end with d4T-triphosphate, using terminal deoxynucleotidyl transferase as previously described (13). Then the gel-purified inhibitor-terminated primer was labeled at its 5' terminus with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase and annealed to template D38 as described above. The 38-mer DNA template primed with 5'-³²P-labeled d4T-terminated 25-mer (D38/25PGA^{d4T}) (0.3 nM) was incubated with varying concentrations of the corresponding RTs in a total volume of 10 μ l of 50 mM Hepes buffer (pH 7.0), containing 15 mM NaCl, 15 mM magnesium acetate, 130 mM potassium acetate, 1 mM dithiothreitol, and 5% (w/v) polyethylene glycol 6000. Following incubation for 10 min at 37 °C, the samples were analyzed on a 6% native polyacrylamide gel in Tris borate buffer (85 mM Tris and 85 mM boric acid, pH 8.0). The amount of template-primer in the RT-bound form was determined by phosphorimaging. The percentage of complexed DNA was plotted against the enzyme concentration, and the $K_{d[DNA]}$ value was determined as the RT concentration at which 50% of the DNA is bound.

Stable Ternary Complex Formation Assays and Determination of dNTP Binding Affinity (Apparent $K_{d(dNTP)}$)—The ability of HIV-1 RT



variants to form a stable ternary complex was assessed as described (32, 33). For this purpose, RTs (20 nM) were incubated with the labeled D38/25PGA^{d4T} template-primer (0.3 nM) to form the binary complex under the conditions described above and then further incubated at 37 °C in the presence of an excess of dNTP (200 μM dATP, in our assay conditions) to obtain a stable ternary complex. The putative ternary complexes formed were challenged with unlabeled D38/25PGA^{d4T} template-primer at a final concentration of 500 nM. The ternary complex species resistant to the DNA trap were resolved on a 6% native polyacrylamide gel, subjected to phosphorimaging, and quantified using the Tina software.

The apparent dNTP binding affinity (apparent $K_{d(\text{dNTP})}$) of the variant RTs was determined as described above, except that the binary complexes were incubated in the presence of increasing concentrations of the complementary nucleotide (dATP, 0–4000 μM) prior to being challenged with the DNA trap. In some experiments, ternary complexes were obtained in the presence of 200 μM foscarnet to monitor the effect of the PPi analogue in the apparent $K_{d(\text{dNTP})}$. The RT-DNA-DNA-dNTP complexes resistant to the trap were resolved and quantified as indicated above. To determine the apparent $K_{d(\text{dNTP})}$, the percentage of total RT-DNA-DNA complex converted into stable RT-DNA-DNA-dNTP ternary complex as a function of the concentration of dNTP was fitted to the single-site ligand-binding equation.

Recombinant Virus and Drug Susceptibility Tests—The assays were performed as previously described (27, 34). Briefly, full-length RT-coding sequence DNA was amplified from plasmids carrying the different RTs using primers IN5 (5'-AATTTTCCATTAGTCTTATTGAACTGTACCA-3') and IN3 (5'-TCTATTCCATCYAAAAATAGTACTTTCCTGATTCC-3'). The PCR products were then cotransfected with an RT-deleted HXB2-D clone in SupT1 cells (35). When the HIV-1 p24 antigen concentration in the cultures surpassed 20 ng/ml, the supernatants were harvested. Progeny virus was propagated and titrated in MT-4 cells. The nucleotide sequence of the RT-coding region of the progeny virus was checked for possible reversions or additional mutations. The SupT1 and MT-4 cells and the deleted HXB2-D clone were obtained from the AIDS Reagent Program (Medical Research Council). HIV-1 drug susceptibility profiles were obtained after infecting 35000 MT-4 cells with 100 50% tissue culture infective doses of virus, at a multiplicity of infection of 0.003, by exposing the HIV-1-infected cultures to various concentrations of each drug (5-fold dilutions). After MT-4 cells were allowed to proliferate for 5 days, the number of viable cells was determined by a tetrazolium-based colorimetric method as described (27, 36).

RESULTS

Mutations Associated with Insertions in the Fingers Subdomain of HIV-1 RT—Although with a relatively low prevalence (0.5–2.7%), several studies have identified heavily treated patients carrying HIV-1 isolates with RTs containing an insertion in the fingers subdomain plus additional resistance mutations, including TAMs (37–41). We have done an extensive survey of the literature to generate a data base containing 200 sequences of RTs having insertions of one or two amino acids between codons 69 and 70 (supplemental table). The most frequently found insertions were Ser-Gly, Ser-Ser, and Ser-Ala, which represented approximately two-thirds of the total number of sequences reported. Interestingly, TAMs frequently associated with insertions include

M41L, K70R, L210W, and T215Y/F. An aromatic residue at position 215 was observed in 90% of all isolates and appeared in all strains having a Ser-Ser insertion. On the other hand, the classical AZT resistance mutation D67N was never found in consensus sequences of insertion-containing RTs from clinical samples, although it has been occasionally observed in clones derived from viral populations (42).

The SS RT is a good model to study the effect of those mutations, because this polymerase contains both the insertion and the T215Y mutation while having wild-type Asp at position 67 (Fig. 1). We constructed mutants having the SS RT background where Tyr-215 was replaced by Thr (SS_Y215T), Ser (SS_Y215S), or Asn (SS_Y215N) or where Asp-67 was replaced by Asn (SS_D67N). The amino acid substitution Y215T involves two nucleotide changes at codon 215, whereas Y215S and Y215N involve just one nucleotide change and are potential intermediates during a possible reversion of Tyr to wild-type Thr. In addition, both the insertion and T215Y were introduced in the sequence context of the wild-type BH10 RT (mutant BH10_SSSY) to determine whether both changes were sufficient to confer resistance to thymidine analogues. The properties of all mutants on primer unblocking, dNTP inhibition, and DNA chain elongation, as well as their ability to form stable ternary complexes were compared with those of reference RTs (*i.e.* SS and BH10 RTs), as well as of mutant SS_2S0S, which lacks the dipeptide insertion while maintaining the SS RT sequence background.

Removal of AZT- and d4T-Monophosphate from Blocked DNA Primers—The ability of RTs to rescue AZT- and d4T-terminated primers was assessed by using the template-primer shown in Fig. 2A. These experiments were carried out in two steps. First, the HIV-1 RT was incubated with the template-primer in the presence of the triphosphate form of the inhibitor. Then unblocking and extension reactions leading to the accumulation of a 38-nucleotide product were carried out by adding dNTPs in the presence of physiological concentrations of ATP or PPi (3.2 mM and 200 μ M, respectively). These reactions can be inhibited by the next complementary dNTP (dATP in our assay conditions), and therefore time courses were carried out in the presence of low dATP concentrations (*i.e.* 1 μ M). Non-complementary dNTPs were included at 100 μ M to facilitate full extension of primers after removal of chain-terminating nucleotides. At these concentrations, inhibition of the rescue reaction because of potential mispairs between the template T and dGTP, dTTP, or dCTP was found to be negligible.

In the presence of ATP, AZT removal reactions catalyzed by SS and mutant SS_D67N RTs showed the highest efficiency, whereas SS RT mutants lacking an aromatic side chain at position 215 (*i.e.* mutants SS_Y215T, SS_Y215N, and SS_Y215S) were devoid of ATP-dependent phosphorolytic activity (Fig. 2B). Substituting Tyr-215 had a larger effect than

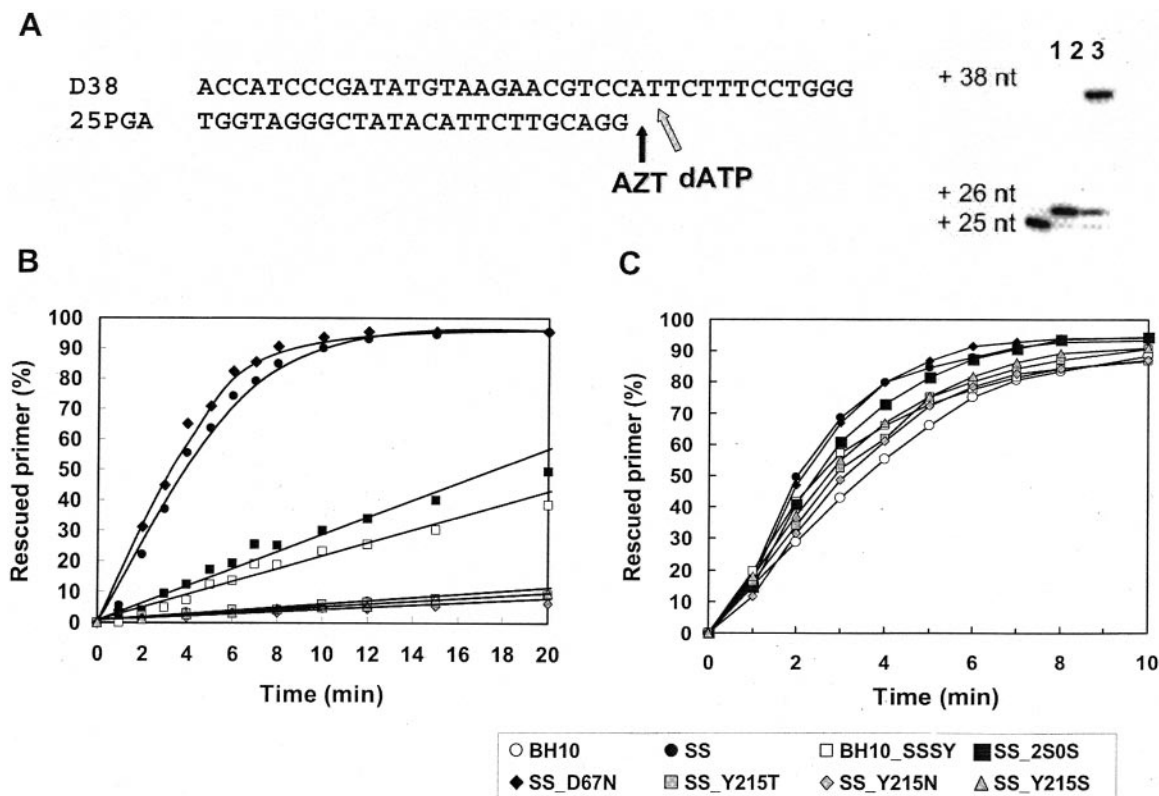


FIG. 2. Effect of mutations on rescue DNA polymerization reactions initiated from AZT-terminated primers. A, reactions were carried out with 38/25-mer heteropolymeric complexes (sequences shown above). First, the inhibitor (AZT) was incorporated at position +1 of the 25-nucleotide primer (lane 1), to generate a 26-nucleotide product (lane 2). Removal of AZT-monophosphate and further extension of the primer in the presence of 3.2 mM ATP or 200 μ M PPI and a mixture of dNTPs leads to the formation of a fully extended 38-nucleotide product (lane 3). The next complementary dNTP (dATP, under the assay conditions) can inhibit the rescue reaction. The time courses of primer rescue reactions carried out in the presence of 3.2 mM ATP or 200 μ M PPI are shown in B and C, respectively. All of the dNTPs in these assays were supplied at 100 μ M, except for dATP whose concentration was 1 μ M. Active enzyme concentration in the assays was 10 nM. The represented values were obtained from two to three independent experiments. The standard deviations were below 20% in these assays.

deleting the two serines forming the insertion. However, the presence of the insertion together with an aromatic residue at position 215, as in mutant BH10_SSSY, was not sufficient to confer the high ATP-dependent phosphorolytic activity displayed by the SS_RT. The large differences observed between mutant enzymes in ATP-dependent phosphorolysis using AZT-terminated primers were not detected in phosphorolytic reactions when PPI was used as the donor (Fig. 2C). All of the enzymes showed AZT-monophosphate removal rates that were within a 2-fold range of each other.

The time courses for dAT removal in the presence of ATP were similar to those obtained with AZT-terminated primers for all tested RTs (Fig. 3A). D67N had no effect on the removal reaction, whereas eliminating the aromatic side chain of Tyr-215 had a deleterious effect of the unblocking activity. Interestingly, some differences were also detected between the enzymes when analyzing PPI-mediated removal of dAT monophosphate from chain-terminated primers. Excision rates were approximately three times higher for SS RT than for mutants SS_Y215T, SS_Y215S, and SS_Y215N (Fig. 3B).

Primer Unblocking Inhibition by the Next Complementary dNTP and Formation of Stable Ternary Complexes—As previously shown, removal reactions can be inhibited by the next complementary nucleotide (13, 27). AZT removal reactions catalyzed by BH10_SSSY, SS, SS_2S0S, and SS_D67N were highly resistant to dNTP inhibition ($IC_{50} > 0.4$ mM), but unblocking of dAT-terminated primers was >20-fold more sensitive to inhibition by the next complementary dNTP (Table I). Under our assay conditions, the pyrophosphate donor (*i.e.* ATP or PPI) or the specific mutation introduced in the recombinant

RT had no significant influence on the IC_{50} values for the next complementary dNTP. However, RTs having a dipeptide insertion between codons 69 and 70 and the T215Y mutation were shown to be >5-fold less sensitive to inhibition by the next complementary dNTP in ATP-dependent removal reactions, using dideoxyadenosine-terminated primers (43). In addition, it has been reported that for AZT- and ddT-terminated primers, the concentration of the next complementary dNTP required to shift the RT from the pretranslocational to the post-translocational stage was remarkably larger for mutant M41L/T69SSS/T215Y than for the wild-type HIV-1 RT (44). In an attempt to clarify why our assay failed to detect differences in RT sensitivity to dNTP inhibition, we analyzed how mutations could impact dNTP binding by looking at ternary complex formation.

Ternary complexes formed by the RT, a dAT-terminated template-primer, and the next complementary dNTP, using wild-type and mutant RTs, were analyzed by electrophoretic mobility retardation assays. For this purpose, each mutant enzyme was first allowed to form binary complexes with 32 P-labeled dAT-terminated template-primers and then supplemented with the next complementary dNTP to form the ternary complex. All of the tested RTs showed normal DNA polymerase activity (data not shown), and the equilibrium dissociation constants (K_d) of the corresponding binary complexes ranged between 1.6 and 7.4 nM (Fig. 4).

Binding of dNTP to the enzyme is an ordered mechanism that occurs only after DNA binding, and the amount of labeled template-primer that remains bound to the RT in the presence of high dNTP concentration and an excess of DNA trap represents the level of stable ternary complex that is formed. This is

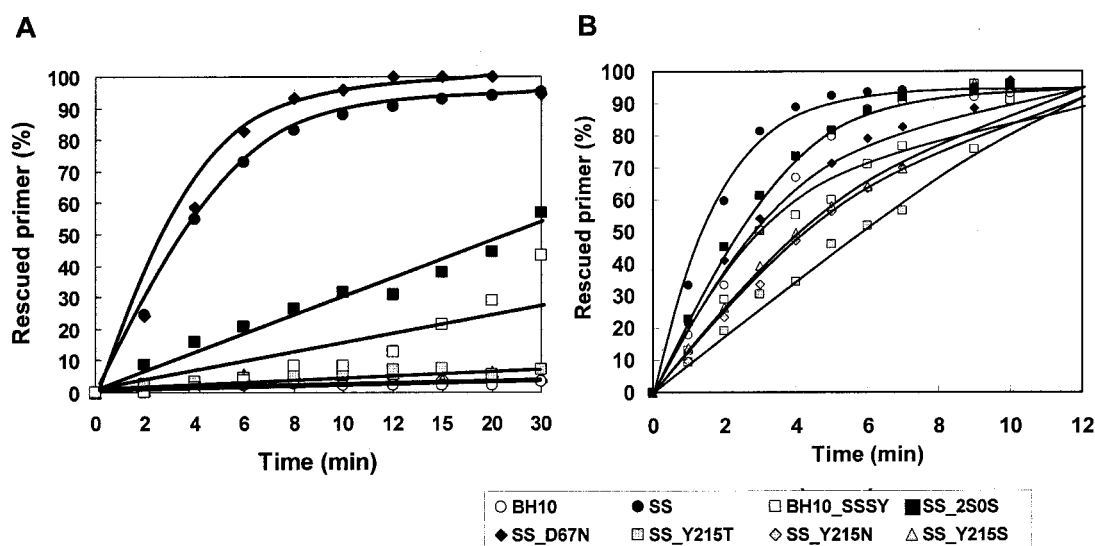


FIG. 3. Effect of mutations on rescue DNA polymerization reactions initiated from d4T-terminated primers. Time courses of primer rescue reactions carried out in the presence of 3.2 mM ATP (A) and 200 μ M PPI (B). The assays were done with the template-primer shown in Fig. 2. All of the dNTPs in the assays were supplied at 100 μ M, except for dATP whose concentration was 1 μ M. Active enzyme concentration in these assays was 10 nM. The represented values were obtained from two to three independent experiments. The standard deviations were below 20% in these assays.

TABLE I
Ability of the next complementary dNTP to inhibit ATP- or PPI-dependent primer rescue by wild-type and mutant RTs

Enzymes	IC ₅₀ for the next dNTP ^a			
	ATP-dependent excision		PPI-dependent excision	
	AZT-terminated primer	d4T-terminated primer	AZT-terminated primer	d4T-terminated primer
	μ M			
BH10	N.D. ^b	N.D.	>400	18.0 \pm 1.9
BH10_SSSY	>400	N.D.	>400	7.6 \pm 1.1
SS	>400	10.1 \pm 1.8	>400	14.7 \pm 1.5
SS_2S0S	>400	11.0 \pm 2.3	>400	18.8 \pm 3.5
SS_D67N	>400	9.1 \pm 1.8	>400	18.1 \pm 2.1
SS_Y215T	N.D.	N.D.	>400	11.3 \pm 0.9
SS_Y215S	N.D.	N.D.	>400	11.9 \pm 1.5
SS_Y215N	N.D.	N.D.	>400	13.0 \pm 1.3

^a The assays were carried out in the presence of 3.2 mM ATP or 200 μ M PPI. All of the dNTPs in these assays were supplied at 100 μ M, except for dATP whose concentration ranged from 1 to 800 μ M, depending on the assay. Active enzyme concentrations in these assays were in the range of 10–20 nM, and the concentration of the template-primer was 30 nM. The samples were incubated for 0–15 min depending on the assay. In all cases, the incubation times were within the linear range of the corresponding time course. The percentage of inhibition was plotted against the concentration of dATP, and the data were fitted to a hyperbola to obtain the IC₅₀ for each enzyme. Reported values were obtained from two to three experiments and are given as the means \pm standard deviations.

^b N.D., not determined due to the low efficiency of the excision reaction.

illustrated in Fig. 5A, which shows the higher stability of the ternary complex *versus* the binary complex using wild-type BH10 RT as a model. In the presence of over 1500-fold molar excess of DNA trap, the RT-DNA-DNA complex was competed out, whereas a significant amount of ternary complex was resistant to competition with DNA trap. The results shown in Fig. 5B, reveal that the RT-DNA-DNA complexes formed by each of the mutant enzymes (*lane 1*) were fully competed out by the DNA trap (*lane 2*), whereas a portion of d4T-terminated template-primer bound in RT-DNA-DNA-dNTP ternary complexes remains stable and resistant to the trap (*lane 4*). This portion was roughly similar for all tested RTs.

Ternary complex formation was tested on the labeled D38/25PGA^{d4T} template-primer as a function of dATP, the next complementary nucleotide (Fig. 6). The apparent $K_{d[dNTP]}$ values for SS, SS_2S0S, and SS_Y215N were >5-fold higher than for the wild-type BH10 RT and somewhat higher than for mutants BH10_SSSY, SS_Y215T, and SS_Y215S (Table II). For most enzymes, the apparent $K_{d[dNTP]}$ values were remarkably higher than the IC₅₀ values obtained in rescue assays carried out in the presence of ATP or PPI (Table I). This dis-

crepancy could be due to the presence of the PPI donor in the reaction. Analyzing ternary complex formation in the presence of ATP or PPI is difficult, because these metabolites are substrates of the phosphorolytic reaction. To circumvent this limitation, we used sodium foscarnet, a PPI analogue. Foscarnet is a relatively weak inhibitor of the replication of recombinant viruses containing wild-type BH10 and SS RTs (27). The foscarnet IC₅₀ values for the recombinant BH10 and SS RTs in primer rescue assays using d4T-terminated primers were 99.8 \pm 7.2 and 46.7 \pm 5.2 μ M, respectively. Foscarnet is expected to bind at the dNTP-binding site, but unlike in the presence of dNTPs, ternary complexes of RT-DNA-DNA-foscarnet are rather unstable even at concentrations of the inhibitor above 200 μ M (data not shown) (45). Interestingly, when RT-DNA-DNA-dNTP complexes were formed in the presence of 200 μ M foscarnet, all of the studied RTs displayed similar apparent $K_{d[dNTP]}$ values (Fig. 6 and Table II).

Viability of Recombinant HIV-1 Variants and Resistance to Nucleoside Analogue Inhibitors—All enzymes described were found to be viable after transfecting cells with a recombinant infectious HIV-1 clone harboring the corresponding RT. All

viruses recovered from transfections were able to infect and replicate in SupT1 cells. Recombinant HIV-1 clones were assayed to measure their susceptibility to nucleoside analogues, including AZT and d4T (Table III). SS RT showed high level resistance to AZT and 3TC and moderate resistance to d4T, ddI, and ddC. Deleting the two-serine insertion or introducing mutations at codons 67 and 215 did not produce large effects on resistance to 3TC, ddC, or ddI. The mutant SS_D67N showed a resistance profile that was very similar to the one displayed by SS RT. However, replacing Tyr-215 with Thr, Ser, or Asn in the multidrug-resistant SS RT led to virus sensitive to both thymidine analogues. On the other hand, introducing the T215Y mutation together with the insertion T69SSS within the wild-type BH10 RT sequence background produce a significant increase in resistance to AZT and particularly to d4T. These data

are in good agreement with the results of the biochemical assays, indicating that Tyr-215 is a very important residue in the acquisition of resistance to thymidine analogues displayed by multidrug-resistant insertion-containing RTs.

DISCUSSION

The presence of a dipeptide insertion at codons 69–70 in combination with amino acid substitutions related to drug resistance (including TAMs) in the HIV-1 RT has been reported by several groups. These viral isolates display high level resistance to AZT and moderate to low level resistance to other NRTIs in phenotypic assays. The insertion by itself does not have a major impact on resistance in the absence of drug-resistant mutations but contributes to AZT resistance in the presence of TAMs and other mutations (27, 46). A good correlation between the results of phenotypic assays and the ATP-dependent phosphorolytic activity displayed by the recombinant RTs has been observed. This activity is higher with AZT-terminated primers, followed by d4T-terminated primers and very low (albeit detectable) for primers terminated with other NRTIs, including cytidine analogues (13) and tenofovir (47).

T215Y is the most frequent mutation associated with dipeptide insertions in the RT-coding region. HIV clones containing the insertion together with mutation T215Y in the sequence context of wild-type BH10 RT had reduced susceptibility to AZT and d4T, although AZT resistance was not as high as with the SS RT that contains additional TAMs such as M41L or L210W. These observations are broadly in agreement with phenotypic data reported by others (26, 28) and correlate with the ATP-dependent phosphorolytic activities displayed by the mutant RTs on AZT- and d4T-terminated primers. Although the presence of a Ser-Ser insertion together with an aromatic side chain at position 215 is sufficient to confer some resistance, it is clear that further changes are needed to achieve the high level resistance displayed by the SS RT. Previously reported evidence revealed that T215Y alone produced a very small increase (<3-fold) in the ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with AZT (48, 49). Therefore, the question of whether Tyr-215 is a requirement for maintaining ATP-dependent phosphorolytic activity on primers blocked with thymidine analogues was addressed by substituting Thr, Ser, and Asn for Tyr-215 in the SS RT. The mutant enzymes obtained were unable to remove AZT-monophosphate and d4T-

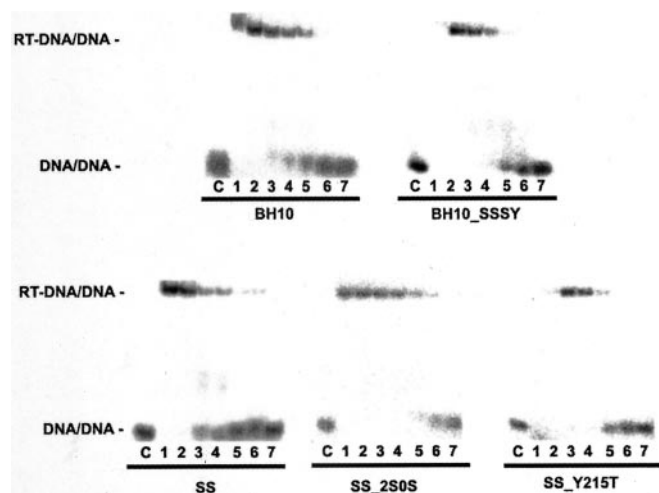


FIG. 4. Gel mobility shift assays for the analysis of DNA binding affinity. The 38-mer DNA primed with 5' 32 P-labeled d4T-terminated 26-mer primer (D38/PG25A^{d4T}) was incubated with varying concentrations of the corresponding RT. A 0.3 nM concentration of D38/PG25A^{d4T} was incubated with different concentrations of enzyme at 37 °C for 10 min. Lanes 1–7 show the formation of the binary complex in the presence of RT concentrations of 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, and 0.625 nM, respectively. C, control in the absence of enzyme. The dissociation constants of the RT-DNA-DNA complexes were: 3.4 ± 0.9 nM for wild-type BH10 RT, 6.3 ± 2.1 nM for BH10_SSSY, 7.4 ± 2.3 nM for SS, 1.6 ± 0.6 nM for SS_2S0S, and 2.7 ± 1.3 nM for SS_Y215T.

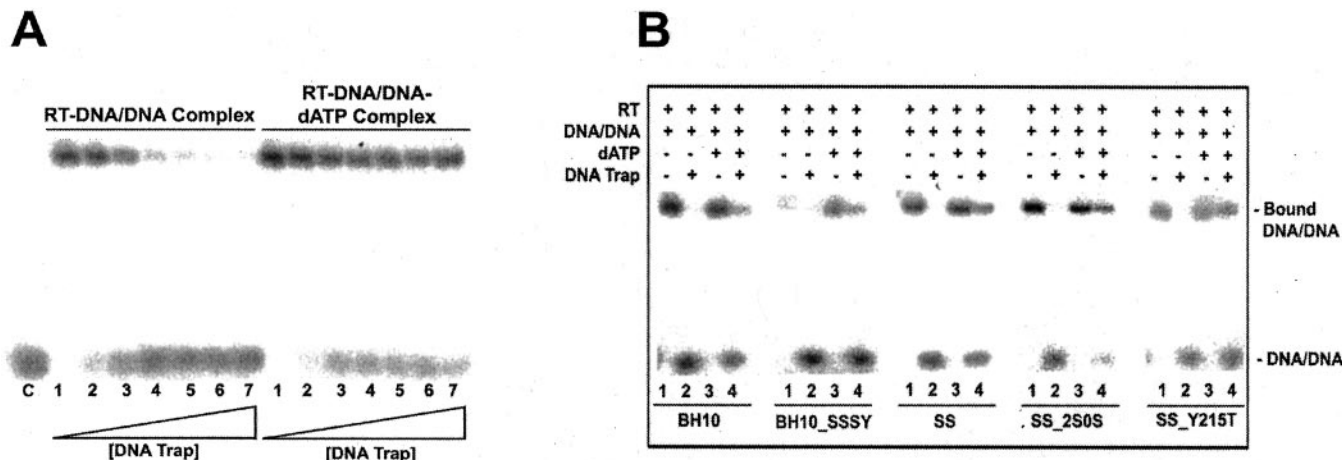


FIG. 5. Effect of DNA trap concentration on the formation of RT-DNA-DNA and RT-DNA-DNA-dNTP complexes. A, binary (left panel) and ternary complexes (right panel) of the wild-type BH10 RT were formed by incubating 20 nM of RT with 0.3 nM radiolabeled D38/25PGA^{d4T}, at 37 °C in the absence or in the presence of complementary dNTP (dATP, 200 μ M). Lanes 1–7 represent DNA trap concentrations of 0, 50, 75, 100, 200, 300, and 500 nM, respectively. B, analysis of the ternary complex formed by derivatives of BH10 and SS RTs. The binary (lane 1) and ternary complex (lane 3) formed by the individual mutant enzymes as described for A were challenged by the addition of DNA trap at 500 nM, and the labeled template-primer bound in the stable ternary complex was analyzed on a nondenaturing polyacrylamide gel. Lanes 2 and 4 represent the extent of dissociation of the template-primer in the binary and ternary complex, respectively.

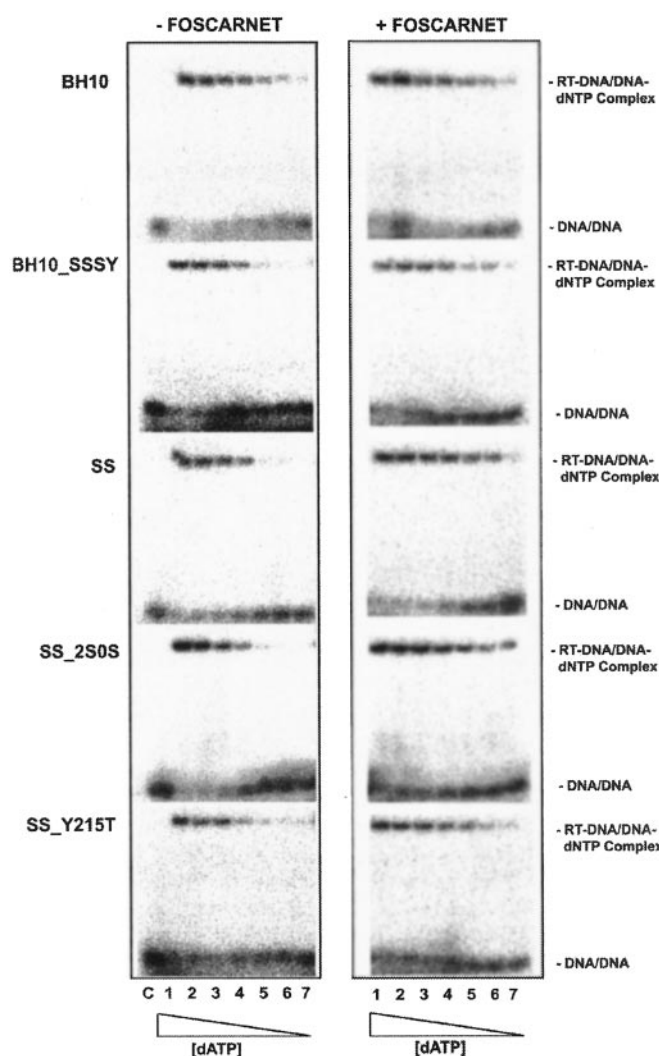


FIG. 6. Determination of the apparent dNTP binding affinity in the ternary complex by gel mobility shift assays. The apparent $K_{d[dNTP]}$ of the studied RTs was determined by incubating RT-DNA-DNA complexes containing a primer terminated with dAT in the presence of different concentrations of dNTP, and subjecting them to gel shift analysis. The positions of free DNA-DNA template-primer and bound in the ternary complex are shown on the right. Lanes 1–7 represent dATP concentrations of 4000, 800, 160, 32, 6.4, 1.28, and 0 μ M, respectively. Lane C stands for a control reaction carried out without enzyme and without dNTP. The gels shown were obtained in the absence (left panel) or in the presence of 200 μ M foscarnet (right panel).

TABLE II
Apparent $K_{d[dNTP]}$ values for wild-type and mutant RTs

The reported values are the averages \pm standard deviations, obtained from two to five independent experiments.

Enzymes	Apparent $K_{d[dNTP]}$	
	Without foscarnet	With foscarnet
	μ M	
BH10	18.8 \pm 8.5	10.8 \pm 8.0
BH10_SSSY	87.9 \pm 12.2	23.5 \pm 9.2
SS	106.3 \pm 25.8	13.4 \pm 5.6
SS_2S0S	129.3 \pm 31.8	10.7 \pm 2.5
SS_Y215T	58.4 \pm 7.7	22.4 \pm 12.2
SS_Y215S	81.4 \pm 13.9	26.9 \pm 7.5
SS_Y215N	109.4 \pm 32.8	39.7 \pm 10.5

monophosphate from inhibitor-terminated primers, and the corresponding mutant viruses were all susceptible to inhibition by thymidine analogues. Interestingly, the PPI-mediated removal activity of primers terminated with dAT, conferred by

Tyr-215 mutants was also reduced in comparison with the parental SS RT. Although the physiological relevance of PPI is not clear, all of these data suggest that these mutations have a significant effect in the optimal alignment of the chain terminated primer relative to the PPI donor.

HIV clones having mutations Y215T, Y215S, or Y215N within the SS RT retained low level resistance to ddI and ddC and high level resistance to 3TC in phenotypic assays. High level resistance to 3TC is expected because of the presence of M184I in all SS-derived clones, but SS RT lacks drug resistance-specific mutations for ddI and ddC (*i.e.* K65R, L74V). It has been shown that primers terminated with ddC and ddA (the active metabolite of ddI) are substrates of the ATP-dependent phosphorolytic activity catalyzed by AZT-resistant RTs carrying the T215Y/F mutation. However, the efficiency of the removal reaction was very low in comparison with thymidine analogues (11–15). For ddA-terminated primers, it has been shown that ATP-dependent removal reactions catalyzed by RTs having mutations M41L/T69SSS/T215Y and M41L/T69SSS/L210W/R211K/L214F/T215Y were 10- and 18-fold more efficient than the wild-type enzyme, whereas the insertion alone had no effect on the unblocking reaction (43). Despite these large differences that point to M41L and T215Y as key determinants for ATP-dependent phosphorolytic activity, none of the recombinant viruses generated with those enzymes showed significant resistance to ddI in phenotypic assays (26). Taken together, these data suggest that the contribution of the ATP-dependent phosphorolytic activity to the low level resistance to ddI observed with SS RT is likely to be small and is probably due to the complex arrangement of drug resistance mutations found in the multidrug-resistant RT.

The efficiency of nucleoside analogue removal under physiological conditions depends on the rate of the reaction but also on the ability of dNTPs to inhibit it. HIV-1 RT bound to a chain-terminated template-primer and an incoming dNTP complementary to the next nucleotide on the template strand forms a stable ternary complex. A crystal structure of a ternary complex containing a dideoxyguanosine-terminated DNA primer complexed with a DNA template and dTTP is available (50) (Fig. 7). Under these conditions, the excision reaction is blocked. The concentrations of dNTP required to inhibit the unblocking reaction have been determined for a number of RTs displaying ATP-dependent phosphorolytic activity (*i.e.* D67N/K70R/T215F/K219Q, M41L/T215Y, M41L/T69SSS/T215Y, etc.) (9, 11, 13, 43). Although the dNTP concentration required to inhibit AZT-monophosphate removal was rather high (IC_{50} 40 to >250 μ M), the IC_{50} values obtained with dAT-, ddT-, and ddA-terminated primers were usually below 25 μ M. These differences have been attributed to the presence of a bulky substituent at the 3' position of the ribose in the AZT-terminated primers that sterically hinders the dNTP-binding site (termed the N site), reducing its accessibility by dNTPs (52). Under our assay conditions none of the mutations tested had a significant effect on the IC_{50} values for AZT and dAT removal. Furthermore, the presence of ATP or PPI had no effect on the inhibition by the next complementary dNTP.

The formation of ternary complexes has been monitored for wild-type BH10 RT and mutant M41L/T69SSS/T215Y with chemical footprinting techniques in the presence of increasing concentrations of the next complementary nucleotide and DNA-DNA complexes having AZT-terminated primers (44). The IC_{50} values obtained were 22 μ M for the wild-type RT and 570 μ M for the mutant containing the insertion. Higher IC_{50} s were also observed with the mutant using DNA-DNA complexes having a ddT-terminated primer. However, large differences were not detected in our assays measuring RT suscepti-

TABLE III
Susceptibility of HIV-1 constructs to NRTIs

The IC₅₀ values represent the means of two to five tests, each one performed six times. The fold increase in IC₅₀ relative to wild-type HXB2 virus control carrying the RT sequence of BH10 is shown in parentheses. The reported values for BH10, BH10_T69SSS, SS, and SS_2S0S RTs were taken from Ref. 27.

RTs	IC ₅₀				
	AZT	d4T	ddC	3TC	ddI
	μM				
BH10	6.6×10^{-3}	0.24	0.23	0.56	1.26
BH10_T69SSS	2.2×10^{-3} (0.3)	0.54 (2.2)	0.14 (0.6)	1.84 (3.3)	1.91 (1.5)
BH10_SSSY	0.043 (6.5)	2.09 (8.7)	1.56 (6.8)	4.6 (8.2)	2.09 (1.7)
SS	5.17 (786)	2.23 (9.1)	1.10 (4.7)	>20 (>35)	13.4 (10.6)
SS_2S0S	0.94 (143)	5.94 (24.2)	2.86 (12.2)	>20 (>35)	11.3 (8.9)
SS_D67N	3.54 (536)	2.62 (10.9)	2.65 (11.5)	>20 (>35)	9.54 (7.6)
SS_Y215T	6.6×10^{-3} (1)	0.49 (2.1)	2.41 (10.5)	>20 (>35)	11.6 (9.2)
SS_Y215S	0.019 (2.9)	0.32 (1.3)	1.49 (6.5)	>20 (>35)	6.31 (5.0)
SS_Y215N	5.8×10^{-3} (0.9)	0.29 (1.2)	1.29 (5.6)	>20 (>35)	4.93 (3.9)

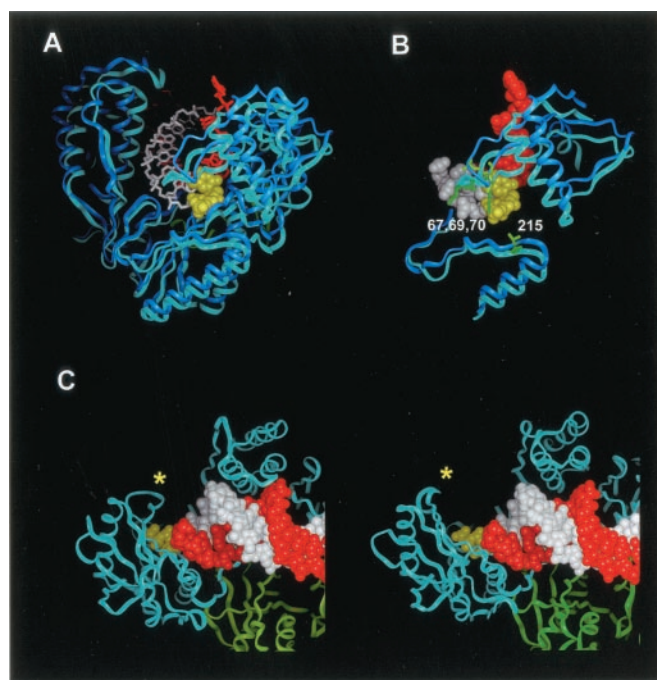


FIG. 7. Structural analysis of HIV-1 RT binary and ternary complexes showing conformational changes of the β 3- β 4 hairpin loop and the location of residue 215. A, superimposition of the α -carbon backbones of the RT forming an RT-DNA-DNA binary (dark blue ribbon) and an RT-DNA-DNA-dNTP ternary complex (light blue ribbon). The template (red) and primer (white) strands shown with a stick representation are those found in the ternary complex. The incoming dNTP is shown in yellow using a CPK representation. B, detailed view of the location of Asp-67, Thr-69, and Lys-70 in the β 3- β 4 hairpin loop and Thr-215 in β -strand 11a to show the conformational changes involved in ternary complex formation. C, shows side views of the ternary (left panel) and binary (right panel) complexes illustrating the large conformational changes involving the tip of the β 3- β 4 hairpin loop (yellow asterisk). The DNA-DNA complex and the incoming dNTP are represented with the same color codes as above but using CPK models. The 66- and 51-kDa subunits are shown using a cyan or a green ribbon representation, respectively. The coordinates have been obtained from Protein Data Bank codes 1RTD (50) and 3HMI (51), and the models have been prepared using the program Insight II (Accelrys Inc.).

bility to dNTP inhibition in AZT and d4T removal reactions. This could be attributed to the RT sequence context or the different assay conditions. However, monitoring ternary complex formation using a gel mobility shift assay has also revealed significant differences in the apparent K_d for dNTP binding with the enzymes described in this work. SS RT was about 6-fold more resistant to dNTP inhibition than the wild-type enzyme. Furthermore, Tyr-215 was partially responsible for the observed differences, because those RTs having Ser or

Thr at position 215 were somewhat more sensitive to inhibition than those with Tyr at this position. The reason for the discrepancy between determinations based on excision followed by extension reactions and those obtained by monitoring ternary complex formation relates to the presence of the PPi donor. Using an excess of foscarnet (a PPi analogue), all of the RTs displayed similar susceptibility to inhibition by the next complementary dNTP. The apparent $K_{d[\text{dNTP}]}$ values were similar to the IC₅₀ values reported for the excision reactions. These results suggest that despite being outside the dNTP-binding site and away from the catalytic pocket, Tyr-215 exerts a significant influence on the conformation of the dNTP-binding pocket. This effect can be counteracted in the presence of a PPi analogue.

Modeling studies have led authors to propose that Tyr-215 (and other TAMs) could participate in ATP binding to facilitate nucleotide analogue excision of chain-terminated primers when the primer terminus sits at the N site (52, 53). Tyr-215 is exposed to the solvent in the crystal structures of RTs containing the mutation T215Y (and other TAMs) (54, 55), and a direct participation of this residue in binding the adenine base of ATP through van der Waals' interactions could occur. However, ATP cannot contact simultaneously the mutated side chains of residues 41 and 215. Available biochemical data are also not consistent with the hypothesis that ATP is bound more tightly by AZT-resistant RTs (15). The available crystal structures of AZT-resistant RTs are complexes of RT bound to a non-nucleoside RT inhibitor and show a conformation where the distance between fingers and thumb subdomains is even larger than in the "open" conformation of the binary complex. In this scenario, the possibility of Tyr-215 (and other TAMs) going through large conformational changes during polymerization that could explain their effects on phosphorolysis cannot be excluded. Another factor that adds further complexity to the study of the mechanism of ATP-based excision is that the removal reaction requires millimolar concentrations of ATP, which are high enough to compete with dNTPs for binding at the N site (56). Available crystal structures of binary and ternary complexes containing the wild-type RT show significant conformational changes at the fingers and thumb subdomains (Fig. 7) that result in a large movement of the β 3- β 4 hairpin loop that contains the insertion in the SS RT. In the closed configuration of the ternary complex, Lys-65 interacts directly with the γ phosphate of the incoming dNTP (50), whereas in the binary complex, this residue is at the tip of the fingers domain, far from the dNTP-binding site (51). In contrast, conformational changes affecting β strand 11a, which contains Thr-215, are less important. Our data suggest that under physiological conditions (*i.e.* high concentrations of ATP), the resistance mechanism is dependent on the orientation of the PPi moiety of the

donor, which appears to be largely affected by the side chain of Tyr-215 and to a lesser extent by the conformation of the β 3- β 4 hairpin loop.

Previous studies have shown that interrupting nucleoside analogue therapy leads to replacement of the multidrug-resistant virus by wild-type strains (42, 57). Replacing Tyr with Thr involves two nucleotide substitutions. However, one mutation (*i.e.* Y215N or Y215S) would be sufficient to abrogate thymidine analogue resistance, thereby facilitating an alternative sensitization pathway. This reversion pathway has not been described in patients infected with strains having insertion-containing RTs, but it is relatively common in patients having the classical AZT resistance mutations (58, 59), where mutations T215D, T215C, and T215S have a relatively low fitness cost in the absence of drugs and are often observed in transmitted virus (60, 61). Mutation D67N is very rare in insertion-containing RTs. Virus population dynamics studies have shown that in some isolates this mutation is detected very early together with T215Y and the insertion but is quickly replaced by D67S, suggesting that D67N confers a fitness loss to the multidrug-resistant virus. Our biochemical studies did not reveal any significant differences between the SS RT and mutant SS_D67N, whereas recombinant virus containing those enzymes were viable and replicated efficiently in SupT1 cells. Detailed studies are currently in progress to measure any possible fitness differences between both enzymes.

REFERENCES

- Telesnitsky, A., and Goff, S. P. (1997) in *Retroviruses* (Coffin, J., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., ed) pp. 121–160, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Menéndez-Arias, L. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 381–388.
- Jonckheere, H., Anné, J., and De Clercq, E. (2000) *Med. Res. Rev.* **20**, 129–154.
- Erickson, J. W., and Burt, S. K. (1996) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 545–571.
- Sluis-Cremer, N., Arion, D., and Parniak, M. A. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1408–1422.
- Selmi, B., Deval, J., Boretto, J., and Canard, B. (2003) *Antivir. Ther.* **8**, 143–154.
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., and Parniak, M. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 15908–15917.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G., and Scott, W. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13471–13476.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Mian, A. M., So, A. G., and Scott, W. A. (1999) *Mol. Cell* **4**, 35–43.
- Sarafianos, S. G., Das, K., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10027–10032.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Schinazi, R. F., So, A. G., and Scott, W. A. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3465–3472.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E., and Hughes, S. H. (2002) *J. Virol.* **76**, 9143–9151.
- Mas, A., Vázquez-Álvarez, B. M., Domingo, E., and Menéndez-Arias, L. (2002) *J. Mol. Biol.* **323**, 181–197.
- Naeger, L. K., Margot, N. A., and Miller, M. D. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2179–2184.
- Ray, A. S., Murakami, E., Basavapathruni, A., Vaccaro, J. A., Ulrich, D., Chu, C. K., Schinazi, R. F., and Anderson, K. S. (2003) *Biochemistry* **42**, 8831–8841.
- Larder, B. A. (1994) *J. Gen. Virol.* **75**, 951–957.
- Winters, M. A., Shafer, R. W., Jellinger, R. A., Mamtara, G., Gingeras, T., and Merigan, T. C. (1997) *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 757–762.
- Izopet, J., Bicart-See, A., Pasquier, C., Sandres, K., Bonnet, E., Marchou, B., Puel, J., and Massip, P. (1999) *J. Med. Virol.* **59**, 507–511.
- Harrigan, P. R., Miller, M. D., McKenna, P., Brumme, Z. L., and Larder, B. A. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1067–1072.
- Margot, N. A., Isaacson, E., McGowan, I., Cheng, A. K., Schooley, R. T., and Miller, M. D. (2002) *AIDS* **16**, 1227–1235.
- Whitcomb, J., Parkin, N. T., Chappey, C., Hellmann, N. S., and Petropoulos, C. J. (2003) *J. Infect. Dis.* **188**, 992–1000.
- Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W.-Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Chokekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., Yarchoan, R., and Mitsuya, H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2398–2402.
- Iversen, A. K. N., Shafer, R. W., Wehrly, K., Winters, M. A., Mullins, J. I., Chesebro, B., and Merigan, T. C. (1996) *J. Virol.* **70**, 1086–1090.
- Winters, M. A., Coolley, K. L., Cheng, P., Girard, Y. A., Hamdan, H., Kovari, L. C., and Merigan, T. C. (2000) *J. Virol.* **74**, 10707–10713.
- Winters, M. A., Coolley, K. L., Girard, Y. A., Levee, D. J., Hamdan, H., Shafer, R. W., Katzenstein, D. A., and Merigan, T. C. (1998) *J. Clin. Invest.* **102**, 1769–1775.
- Larder, B. A., Bloor, S., Kemp, S. D., Hertogs, K., Desmet, R. L., Miller, V., Sturmer, M., Staszewski, S., Ren, J., Stammers, D. K., Stuart, D. I., and Pauwels, R. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1961–1967.
- Mas, A., Parera, M., Briones, C., Soriano, V., Martínez, M. A., Domingo, E., and Menéndez-Arias, L. (2000) *EMBO J.* **19**, 5752–5761.
- Lennerstrand, J., Stammers, D. K., and Larder, B. A. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2144–2146.
- Martín-Hernández, A. M., Domingo, E., and Menéndez-Arias, L. (1996) *EMBO J.* **15**, 4434–4442.
- Martín-Hernández, A. M., Gutiérrez-Rivas, M., Domingo, E., and Menéndez-Arias, L. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 1383–1389.
- Astatke, M., Grindley, N. D. F., and Joyce, C. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1945–1954.
- Tong, W., Lu, C.-D., Sharma, S. K., Matsuura, S., So, A. G., and Scott, W. A. (1997) *Biochemistry* **36**, 5749–5757.
- Sharma, B., Kaushik, N., Singh, K., Kumar, S., and Pandey, V. N. (2002) *Biochemistry* **41**, 15685–15697.
- Gutiérrez-Rivas, M., Ibáñez, A., Martínez, M. A., Domingo, E., and Menéndez-Arias, L. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 615–625.
- Kellam, P., and Larder, B. A. (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 23–30.
- Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., and De Clercq, E. (1988) *J. Virol. Methods* **20**, 309–321.
- Balotta, C., Violin, M., Monno, L., Bagnarelli, P., Riva, C., Facchi, G., Berlusconi, A., Lippi, M., Rusconi, S., Clementi, M., Galli, M., Angarano, G., and Moroni, M. (2000) *J. Acquir. Immune Def. Syndr.* **24**, 232–240.
- Tamalet, C., Izopet, J., Koch, N., Fantini, J., and Yahi, N. (1998) *AIDS* **12**, F161–F166.
- Van Vaerenbergh, K., van Laethem, K., Albert, J., Boucher, C. A. B., Clotet, B., Floridia, M., Gerstoft, J., Hejdemann, B., Nielsen, C., Pannecoque, C., Perrin, L., Pirillo, M. F., Ruiz, L., Schmit, J.-C., Schneider, F., Schoolmeester, A., Schuurman, R., Stellbrink, H. J., Stuyver, L., van Lunzen, J., van Remoortel, B., van Wijngaarden, E., Vella, S., Witvrouw, M., Yerly, S., De Clercq, E., Desmyter, J., and Vandamme, A.-M. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2109–2117.
- Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., Ruffault, A., Mohammed, A. S., Cottalorda, J., Schmuck, A., Calvez, V., Dam, E., Fleury, H., Brun-Vézinet, F., and the ANRS AC11 Resistance Study Group (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1836–1842.
- Schneider, V., Legoff, J., Bélec, L., Delphin, N., Dutreuil, C., Kara-Mostefa, A., Rozenbaum, W., and Nicolas, J.-C. (2004) *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 127–136.
- Lukashov, V. V., Huismans, R., Jebbink, M. F., Danner, S. A., De Boer, R. J., and Goudsmit, J. (2001) *AIDS Res. Human Retrovir.* **17**, 807–818.
- Meyer, P. R., Lennerstrand, J., Matsuura, S. E., Larder, B. A., and Scott, W. A. (2003) *J. Virol.* **77**, 3871–3877.
- Marchand, B., and Götte, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 35362–35372.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Zonari, D., Chopra, R. R., Pendarvis, E., Bazmi, H. Z., Mellors, J. W., and Scott, W. A. (2003) *J. Virol.* **77**, 6127–6137.
- Quiñones-Mateu, M. E., Tadele, M., Parera, M., Mas, A., Weber, J., Rangel, H. R., Chakraborty, B., Clotet, B., Domingo, E., Menéndez-Arias, L., and Martínez, M. A. (2002) *J. Virol.* **76**, 10546–10552.
- White, K. L., Chen, J. M., Margot, N. A., Wrinn, T., Petropoulos, C. J., Naeger, L. K., Swaminathan, S., and Miller, M. D. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 992–1003.
- Naeger, L. K., Margot, N. A., and Miller, M. D. (2001) *Antivir. Ther.* **6**, 115–126.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Tolun, A. A., Pfeifer, I., So, A. G., Mellors, J. W., and Scott, W. A. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1540–1545.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L., and Harrison, S. C. (1998) *Science* **282**, 1669–1675.
- Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Jacobo-Molina, A., Tantil, C., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1998) *J. Mol. Biol.* **284**, 1095–1111.
- Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumar, P., Ramesha, A. R., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2002) *EMBO J.* **21**, 6614–6624.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E., and Hughes, S. H. (2001) *J. Virol.* **75**, 4832–4842.
- Ren, J., Esnouf, R. M., Hopkins, A. L., Jones, E. Y., Kirby, I., Keeling, J., Ross, C. K., Larder, B. A., Stuart, D. I., and Stammers, D. K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9518–9523.
- Chamberlain, P. P., Ren, J., Nichols, C. E., Douglas, L., Lennerstrand, J., Larder, B. A., Stuart, D. I., and Stammers, D. K. (2002) *J. Virol.* **76**, 10015–10019.
- Cases-González, C. E., Gutiérrez-Rivas, M., and Menéndez-Arias, L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19759–19767.
- Briones, C., Mas, A., Gómez-Mariano, G., Altisent, C., Menéndez-Arias, L., Soriano, V., and Domingo, E. (2000) *Virus Res.* **66**, 13–26.
- Goudsmit, J., de Ronde, A., de Rooij, E., and de Boer, R. (1997) *J. Virol.* **71**, 4479–4484.
- Yerly, S., Rakik, A., Kinloch de Loes, S., Hirschel, B., Descamps, D., Brun-Vézinet, F., and Perrin, L. (1998) *J. Virol.* **72**, 3520–3523.
- De Ronde, A., van Dooren, M., van der Hoek, L., Bouwhuis, D., de Rooij, E., van Gemen, B., de Boer, R., and Goudsmit, J. (2001) *J. Virol.* **75**, 595–602.
- García-Lerma, J. G., Nidha, S., Blumoff, K., Weinstock, H., and Heneine, W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13907–13912.

Suppression of Multidrug-resistant HIV-1 Reverse Transcriptase Primer Unblocking Activity by α -Phosphate-modified Thymidine Analogues

Tania Matamoros¹, Jérôme Deval², Catherine Guerreiro³
Laurence Mulard³, Bruno Canard² and Luis Menéndez-Arias^{1*}

¹Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa", Consejo
Superior de Investigaciones
Científicas-Universidad
Autónoma de Madrid, 28049
Madrid, Spain

²Centre National de la
Recherche Scientifique et
Universités d'Aix-Marseille I
and II, UMR 6098, Architecture
et Fonction des Macromolécules
Biologiques, ESIL-Case 925
163 avenue de Luminy, 13288
Marseille cedex 9, France

³Institut Pasteur, Unité de
Chimie Organique, 28 rue du
Dr. Roux, 75724 Paris cedex 15
France

A dipeptide insertion between codons 69 and 70 together with the amino acid substitution T215Y in the reverse transcriptase (RT)-coding region of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains are known to confer phenotypic resistance to zidovudine (AZT) and stavudine (d4T). Phenotypic resistance correlates with an increased ATP-dependent phosphorolytic activity. Nucleoside α -boranophosphate diastereoisomers derived from AZT and d4T were tested as substrates of a multidrug-resistant HIV-1 RT (designated as SS RT) bearing a Ser-Ser insertion at codons 69–70 and other drug resistance-related mutations, in DNA polymerization assays and ATP-mediated excision reactions. Using pre-steady-state kinetics, we show that SS RT can incorporate both R_p and S_p diastereoisomers, although R_p is the preferred isomer. Chirality at the internucleotidic linkage formed upon incorporation of nucleoside α -boranophosphate did not affect ATP-mediated excision. As reported for AZT and d4T-terminated primers, substituting Thr, Asn or Ser for Tyr215 abrogates the ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with α -boranophosphate derivatives of thymidine analogues. However, unlike in the case of AZT, eliminating the dipeptide insertion in SS RT had no effect on the ATP-mediated excision of primers terminated with α -boranophosphate derivatives of d4T. Studies with ATP analogues showed that exchanging a non-bridging oxygen atom at the γ -phosphate group for sulfur causes a significant reduction of the ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT. Interestingly, SS RT's excision activity is completely eliminated upon phosphorothioate substitution at the 3' end of primers terminated with AZT. These results suggest that phosphorothioate derivatives of currently approved drugs could be useful against excision-proficient HIV-1 strains.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: HIV; reverse transcriptase; drug resistance; thymidine analogues; phosphorothioates

*Corresponding author

Abbreviations used: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; RT, reverse transcriptase; NRTI, nucleoside analogue RT inhibitor; NNRTI, non-nucleoside RT inhibitor; AZT, 3'-azido-3'-deoxythymidine; d4T, 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine; ddI, 2',3'-dideoxyinosine; 3TC, 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine; ddC, 2',3'-dideoxycytidine; FTC, 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine; PPi, pyrophosphate; AZTTP, AZT-triphosphate; d4TTP, d4T-triphosphate; TAM, thymidine analogue resistance mutation; BH₃, borane; AZTMP, AZT-monophosphate; AZTTP α S, 3'-azido-3'-deoxythymidine-5'-O-(1-thiotriphosphate); APS, adenosine-5'-O-phosphosulfate; ATP γ S, adenosine-5'-(γ -thio)-triphosphate; AppNHp, adenosine-5'-[(β,γ -imido)]triphosphate; β -methylene-APS, β -methylene-adenosine-5'-phosphosulfate.

E-mail address of the corresponding author:
Imenendez@cbm.uam.es

Introduction

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) is responsible for the conversion of viral genomic RNA into a double-stranded DNA intermediate that is integrated into the host cell DNA. It is a multifunctional enzyme with RNA and DNA-dependent DNA polymerase, RNase H, strand transfer and strand displacement activities. The mature RT is a heterodimer composed of two subunits of 66 kDa and 51 kDa, with sub-domains termed fingers, thumb, palm and connection in both subunits and an RNase H domain in the large subunit only.

Reverse transcription is an important target for antiretroviral intervention. Drugs targeting the viral polymerase include nucleoside analogue inhibitors (NRTIs), acyclic nucleoside phosphonates, and non-nucleoside RT inhibitors (NNRTIs).^{1,2} As of today, seven NRTIs have been approved for clinical use: 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT, zidovudine), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine (d4T, stavudine), 2',3'-dideoxyinosine (ddI, didanosine), 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC, lamivudine), 2',3'-dideoxycytidine (ddC, zalcitabine), (1S,4R)-4-[2-amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purin-9-yl]-2-cyclopentene-1-methanol (abacavir), and 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine (FTC, emtricitabine), as well as one acyclic nucleoside phosphonate: 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]-adenine (tenofovir), while others are in preclinical development.²⁻⁴ Each of these pro-drugs needs to be phosphorylated to its active 5'-triphosphate form in order to compete with their natural dNTP counterpart for incorporation into DNA.

Although combination regimens containing one or two NRTIs have dramatically reduced the morbidity and mortality among patients infected with HIV-1, currently available NRTIs have several weaknesses, including short and long-term adverse effects, mitochondrial toxicity, antagonism with other anti-retrovirals and, as with all anti-retroviral drugs, the development of drug-resistant or multi-drug-resistant HIV strains. Mutations conferring NRTI resistance act either by (i) interfering with the ability of HIV-1 RT to incorporate the triphosphate forms of the drugs,^{5,6} or (ii) increasing the removal of 3'-terminal chain-terminating inhibitors from blocked DNA primers in the presence of physio-

logical concentrations of pyrophosphate (PPi) or ATP.⁷⁻⁹

The Q151M complex, which includes the amino acid substitutions A62V, V75I, F77L, F116Y and Q151M is an example of a multi-NRTI resistance pattern that renders RTs with reduced ability to incorporate nucleotide analogues, such as AZT-triphosphate (AZTTP), d4T-triphosphate (d4TTP), ddCTP and ddATP.^{10,11} On the other hand, the accumulation of thymidine analogue resistance mutations (TAMs), (i.e. M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, and K219Q/E) have a clinical impact on AZT, d4T, ddI, abacavir and tenofovir resistance, while showing enhanced ATP-mediated excision of primers terminated with thymidine analogues.^{8,12-14} Multi-drug-resistant RTs containing the amino acid substitution T69S plus a dipeptide insertion (usually Ser-Ser, Ser-Gly or Ser-Ala) between positions 69 and 70, in a background of multiple TAMs showed largely increased ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with AZT, d4T, ddA or tenofovir.¹⁵⁻¹⁹ Biochemical data are consistent with results of phenotypic assays showing that the corresponding viruses had high-level resistance to AZT and moderate levels of resistance to other NRTIs, such as d4T, ddC, and ddI.^{15,20-22}

In previous studies, we showed that modified nucleotide analogues, in which one non-bridging oxygen atom in the α -phosphate of nucleoside 5'-triphosphate is replaced by a borane (BH₃) group, were effective inhibitors of mutant RTs bearing drug resistance mutations such as K65R,²³ Q151M,²⁴ or the combination A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M.²⁴ Those mutations reduce the catalytic rate constant (k_{pol}) of incorporation of ddATP and AZTTP. Resistance to these inhibitors can be suppressed *in vitro* by the presence of the BH₃ group on the α -phosphate of ddNTPs or AZTTP. The BH₃ group enhances the catalytic rate constant of incorporation of the dideoxy analogues without affecting their binding to the RT active site.²³⁻²⁵ It has also been reported that α -borano derivatives exhibit increased stability towards repair mechanisms that contribute to drug resistance, in assays carried out with mutant D67N/K70R/T215F/K219Q and the R_p diastereoisomer form of α -BH₃-AZTTP, in the presence of high concentrations of PPi.^{26,27} Here, we have extended those studies to

	41	43	62	69	70	104	108	118	123	135	162	172	179	181	184	196	207	210	214	221	283	293	297	301	324	333
BH10	..M.K.	..A.D.	..T.-	..K..	..V..	..V..	..D..	..I..	..S..	..K..	..V.Y.	..M..	..GQ..	..Q..	..L..	..LT..	..H..	..L..	..I..	..E..	..L..	..D..	..GQ..
BH10_SSSY	SSS
SS	..L.E.	..V...	SSSR	..R..	..I..	..I..	..E..	..T..	..A..	..R..	..I..	..C..	..I..	..EK..	..E..	..W..	..FY..	..Y..	..I..	..V..	..T..	..M..	..E..	..EH..
SS_2S0S	..L.E.	..V...	SSSR	..R..	..I..	..I..	..E..	..T..	..A..	..R..	..I..	..C..	..I..	..EK..	..E..	..W..	..FY..	..Y..	..I..	..V..	..T..	..M..	..E..	..EH..
SS_D67N	..L.E.	..V.N.	SSSR	..R..	..I..	..I..	..E..	..T..	..A..	..R..	..I..	..C..	..I..	..EK..	..E..	..W..	..FY..	..Y..	..I..	..V..	..T..	..M..	..E..	..EH..
SS_Y215T	..L.E.	..V...	SSSR	..R..	..I..	..I..	..E..	..T..	..A..	..R..	..I..	..C..	..I..	..EK..	..E..	..W..	..FY..	..Y..	..I..	..V..	..T..	..M..	..E..	..EH..
SS_Y215S	..L.E.	..V...	SSSR	..R..	..I..	..I..	..E..	..T..	..A..	..R..	..I..	..C..	..I..	..EK..	..E..	..W..	..FS..	..Y..	..I..	..V..	..T..	..M..	..E..	..EH..
SS_Y215N	..L.E.	..V...	SSSR	..R..	..I..	..I..	..E..	..T..	..A..	..R..	..I..	..C..	..I..	..EK..	..E..	..W..	..FN..	..Y..	..I..	..V..	..T..	..M..	..E..	..EH..

Figure 1. Amino acid sequence differences within residues 1–350 of wild-type BH10 and SS RTs and mutants analyzed in this study. Residues that are identical to those found in the wild-type BH10 RT are indicated by dots. Underlined amino acid residues are those related to drug resistance.

HIV-1 RTs bearing a Ser-Ser insertion and a series of drug resistance mutations, including TAMs such as M41L, L210W and/or T215Y (Figure 1), by comparing their ATP and PPI-dependent phosphorolytic activities on R_p and S_p diastereoisomers of α -BH₃-AZTTP and α -BH₃-d4TTP. In addition, we tested the excision ability of those enzymes on primers terminated with phosphorothioate derivatives of AZT-monophosphate (AZTMP), such as those resulting from the incorporation of R_p or S_p diastereoisomers of 3'-azido-3'-deoxythymidine-5'-O-(1-thiotriphosphate) (AZTTP α S).

Results

Pre-steady-state kinetics of incorporation of α -BH₃-AZTTP diastereoisomers by wild-type BH10 and SS RTs

Discrimination of AZTTP derivatives relative to dTTP can be measured using pre-steady-state kinetics of incorporation of a single nucleotide into DNA by RT. In these experiments, the binding affinity (K_d) of a nucleotide can be determined together with the rate constant k_{pol} of phosphodiester bond formation. The ratio k_{pol}/K_d is defined as the efficiency of nucleotide incorporation into DNA, and allows the comparison of incorporation efficiencies between any nucleotide substrates. The selectivity values obtained for the incorporation of AZTTP relative to dTTP using the wild-type BH10 and the SS RTs were rather similar (0.4 and 0.36, respectively) (Table 1), and consistent with our previous results based on the determination of steady-state kinetic parameters (k_{cat} and K_m).¹⁵ For both RTs, the catalytic efficiencies of nucleotide incorporation were lower for AZTTP than for dTTP due to the reduced k_{pol} values of AZTTP incorporation.

The introduction of a BH₃ group on the α -phosphate of AZTTP generated a chiral center. The comparison of pre-steady-state kinetic constants for the incorporation of R_p and S_p diastereoisomers of α -BH₃-AZTTP showed that the R_p diastereoisomer is a substantially better substrate for both BH10 and SS RTs. The kinetic parameters for the incorporation

of α -(R_p)-BH₃-AZTTP were similar to those obtained with the natural substrate, dTTP. Although, incorporation of the S_p diastereoisomer was found to be significant with both RTs, the catalytic rate constants were reduced by about tenfold in comparison with the R_p diastereoisomer. In addition, the S_p diastereoisomer showed a six- to eightfold reduced nucleotide binding affinity in comparison with α -(R_p)-BH₃-AZTTP. Overall, the preference for the R_p over the S_p isomer is 65-fold (SS RT) and 80-fold (BH10 RT) as determined by the selectivity ratios shown in Table 1.

ATP-mediated excision of primers terminated with boranophosphate derivatives of AZT

It was shown that resistance to AZT displayed by the SS RT is mediated by its enhanced ATP-dependent phosphorolytic activity on AZTMP-terminated primers. We compared the ATP-mediated excision efficiency of wild-type BH10 and SS RTs on primers terminated with AZTMP, α -(S_p)-BH₃-AZTMP, and α -(R_p)-BH₃-AZTMP, using an heteropolymeric DNA/DNA template-primer (Figure 2(a)). In DNA polymerase-catalyzed reactions, the incorporation of R_p or S_p diastereoisomers of nucleoside 5'- α -thiotriphosphates proceed with an inversion of the configuration at phosphorous.^{28,29} However, it is not clear whether this change of configuration occurs with α -boranophosphate derivatives. For clarity, here we have assumed that the incorporation of α -(R_p)-BH₃-AZTTP leads to the formation of α -(S_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers, while the incorporation of α -(S_p)-BH₃-AZTTP leads to the formation of α -(R_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers.

The multi-drug-resistant SS RT is able to unblock and extend very efficiently primers terminated with all of the AZT derivatives (Figure 2(b)). On the other hand, wild-type BH10 RT showed significant ATP-dependent phosphorolytic activity with primers terminated with both diastereomeric forms of α -BH₃-AZTMP, in contrast with data obtained with primers terminated with AZTMP. SS RT was also tested for its ability to rescue primers terminated with AZT derivatives in the presence of ATP

Table 1. Pre-steady-state kinetic constants for the incorporation of dTTP, AZTTP, and diastereoisomers of α -borano-AZTTP on a heteropolymeric template-primer by wild-type BH10 RT and SS RT

	BH10 RT				SS RT			
	dTTP	AZTTP	α -(R_p)-BH ₃ -AZTTP	α -(S_p)-BH ₃ -AZTTP	dTTP	AZTTP	α -(R_p)-BH ₃ -AZTTP	α -(S_p)-BH ₃ -AZTTP
K_d (μ M) ^a	11	15	7.7	60	10	7.8	10	67
k_{pol} (s^{-1}) ^a	6.6	3.8	7.4	0.72	2.8	0.85	3.2	0.32
k_{pol}/K_d ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	0.6	0.25	0.96	0.012	0.28	0.1	0.32	0.0048
Selectivity ^b	–	0.4	1.6	0.02	–	0.36	1.1	0.017
Resistance ^b	–	–	–	–	–	0.9	0.7	0.9

^a K_d and k_{pol} were determined as described in Materials and Methods. Standard deviations were <20%.

^b The selectivity is the ratio of [k_{pol}/K_d (thymidine analogue)]/[k_{pol}/K_d (dTTP)], while for each inhibitor, resistance was calculated as the selectivity value obtained with SS RT divided by the selectivity obtained with the wild-type BH10 RT.

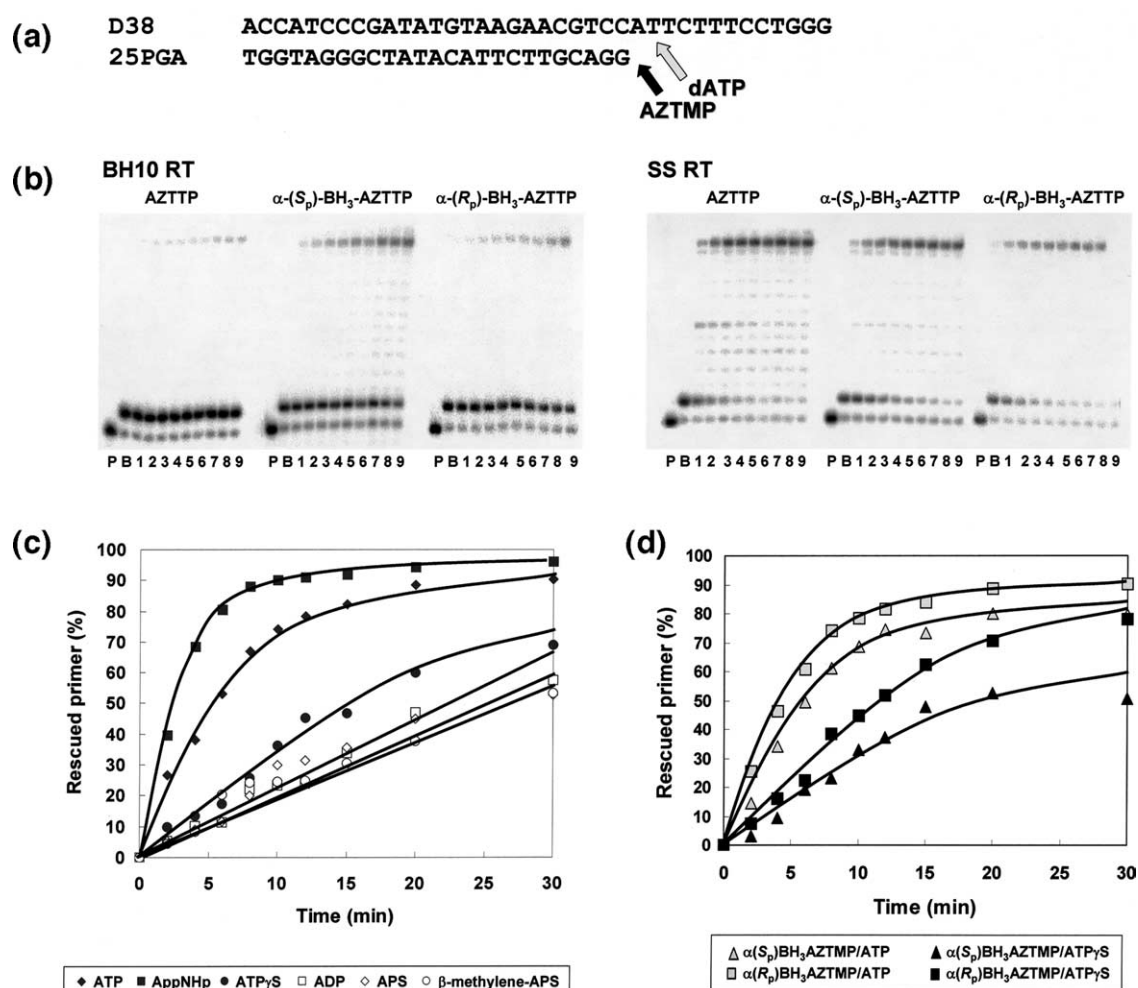


Figure 2. Rescue DNA polymerization initiated from AZTMP-terminated primers. (a) Reactions were carried out with 38/25-mer heteropolymeric complexes (sequences shown above). First, the inhibitor (i.e. AZTTP) was incorporated at position +1 of the 25 nucleotide primer, to generate a 26 nucleotide product. Excision of AZTMP and further extension of the primer in the presence of a PPi donor leads to the formation of a fully extended 38-nucleotide product. The next complementary dNTP (dATP, under the assay conditions) can inhibit the rescue reaction. (b) Rescue reactions carried out with primers terminated with AZTMP, α -(R_p)-BH₃-AZTMP and α -(S_p)-BH₃-AZTMP, using wild-type BH10 and SS RTs. Lanes P and B represent the 25 nucleotide primer before and after treatment with the inhibitor. The time course of the reaction is shown in lanes 1–9 which correspond to aliquots removed 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 30 minutes after addition of 3.2 mM ATP. (c) Time courses of rescue reactions on AZTMP-terminated primers catalyzed by SS RT, obtained in the presence of 1 mM ATP, adenosine-5'-[(β , γ)-imido]triphosphate (AppNHp), adenosine-5'-(γ -thio)-triphosphate (ATP γ S), ADP, APS or β -methylene-APS. (d) Comparison of time courses of primer rescue reactions catalyzed by SS RT in the presence of ATP or ATP γ S (1 mM) with primers terminated with α -(S_p)-BH₃-AZTMP or α -(R_p)-BH₃-AZTMP. In all assays, the RT and template-primer concentrations were 24 nM and 30 nM, respectively.

and ADP analogues, at 1 mM concentration. ATP and ADP derivatives used in these assays were commercially available compounds with substitutions at the β or γ -phosphate groups, or modified at their α , β - or β , γ -phosphodiester bonds. The obtained results revealed that the oxygen bound to the γ -phosphate in ATP plays a key role in the rescue reaction (Figure 2(c) and (d)). Substituting the β -phosphate with sulfur as in adenosine-5'-O-phosphosulfate (APS) or β -methylene-APS had no effect on the primer rescue rate, which was similar to the one obtained with ADP. The introduction of an imido group (containing a chiral nitrogen atom), instead of the β , γ -phosphodiester bond of ATP, produced a 1.5-fold increase of the

excision activity. However, the substitution of one of the oxygen atoms bound to the γ -phosphate of ATP by a sulfur atom produced a twofold reduction of the primer rescue rate. This reduction was observed not only with AZTMP-terminated primers (Figure 2(c)), but also with primers terminated with α -(S_p)-BH₃-AZTMP or α -(R_p)-BH₃-AZTMP (Figure 2(d)). Although the presence of the sulfur substituent in the adenosine-5'-(γ -thio)-triphosphate (ATP γ S) does not introduce any chirality, it should be noted that, in principle, excision reactions carried out with ATP γ S can lead to the formation of two isomers of the corresponding dinucleoside tetraphosphate product.

Effect of mutations on the excision of α -BH₃-AZTMP and α -BH₃-d4TMP from blocked DNA primers

The ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT is modulated by amino acid residues in the fingers subdomain of HIV-1 RT (i.e. the diserine insertion between codons 69 and 70), and amino acid substitutions which are likely involved in ATP binding (i.e. T215Y). We used a panel of mutant RTs available from a previous study (see Figure 1) to compare the effects of the BH₃ group on rescue reactions carried out in the presence of ATP or PPI. The results are shown in Figure 3. The ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT and its mutant derivatives SS_D67N and SS_2S0S was very high with both α -(S_p)-BH₃-AZTMP- and α -(R_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers (Figure 3(a) and (b), respectively). On the other hand, the wild-type BH10 RT showed low but significant excision activity, similar to that observed with mutants SS_Y215N, SS_Y215S, and SS_Y215T. The presence of the Ser-Ser insertion together with the amino acid substitution T215Y, in an otherwise wild-type background had a significant increase on the ATP-mediated excision activity, but only on primers terminated with α -(R_p)-BH₃-AZTMP.

The differences observed between the tested RTs were relatively small in assays carried out in the presence of 200 μ M PPI, except in the case of mutant SS_Y215S, which showed lower pyrophosphorolytic activity on primers terminated with α -(S_p)-BH₃-AZTMP. Under those conditions, no significant differences in excision efficiency were found between borane-substituted and unsubstituted terminators, in contrast with our reported results.²⁶ Although we do not have a clear explanation for this discrepancy, experimental conditions as well as the nature of the RT used (p66/p51 *versus* p66/p66) could explain the difference in excision rate. Indeed, p66/p66 are more difficult to purify free of contaminating nucleases that, in turn, may prove sensitive to the presence of the BH₃ group.

In assays carried out with primers terminated with α -BH₃-d4TMP, the multi-drug-resistant SS RT and mutant SS_D67N showed high ATP-dependent phosphorolytic activity, while rescue efficiency was very low for mutants SS_Y215N, SS_Y215S and SS_Y215T (Figure 4). Unlike in the case of α -borano derivatives of AZTTP, the excision efficiency of the wild-type BH10 RT was almost negligible. In addition, the deletion of the dipeptide insertion found in SS RT (mutant SS_2S0S) produced a significant reduction of the ATP-mediated excision

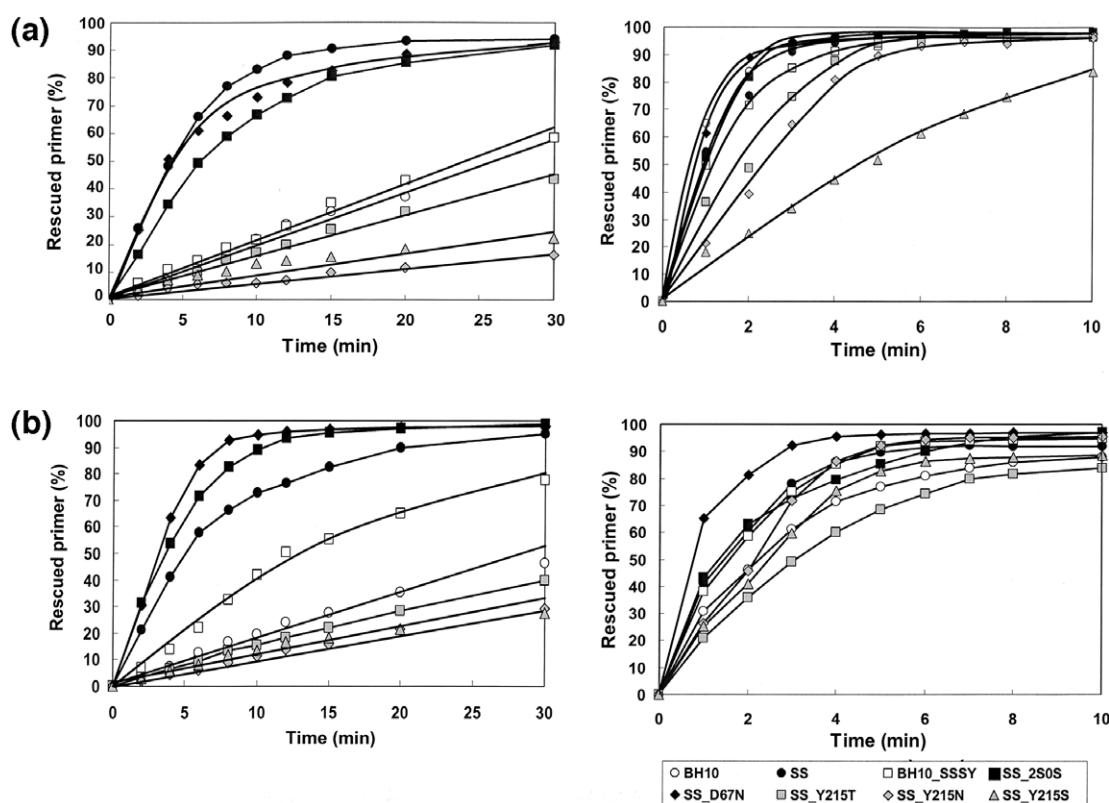


Figure 3. Effect of mutations on rescue DNA polymerization reactions initiated from primers terminated with α -borano derivatives of AZTMP. Time courses of primer rescue reactions carried out with primers terminated with α -(S_p)-BH₃-AZTMP (a) or α -(R_p)-BH₃-AZTMP (b). Panels shown on the left correspond to reactions carried out in the presence of 3.2 mM ATP, while those on the right were obtained with 200 μ M PPI. The assays were done with the template-primer shown in Figure 2. All of the dNTPs in the assays were supplied at 100 μ M, except for dATP whose concentration was 1 μ M. Active enzyme concentration in these assays was 15–30 nM. Represented values were obtained from two to three independent experiments. Standard deviations were <20% in these assays.

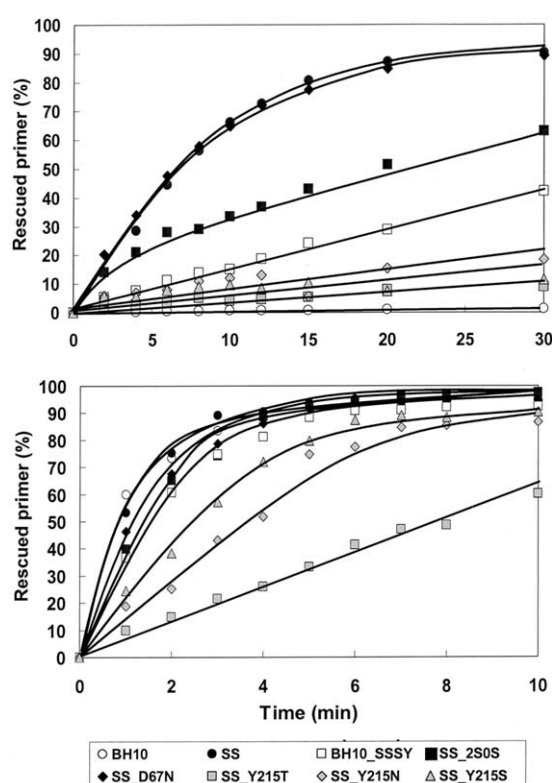


Figure 4. Effect of mutations on rescue DNA polymerization reactions initiated from primers terminated with α -BH₃-d4TMP. Time courses of primer rescue reactions carried out in the presence of 3.2 mM ATP (upper panel) or 200 μ M PPI (lower panel). All of the dNTPs in the assays were supplied at 100 μ M, except for dATP whose concentration was 1 μ M. Active enzyme concentration in these assays was 24 nM. Represented values were obtained from two to three independent experiments. Standard deviations were <20% in these assays.

activity, an effect that was not observed with α -(S_p)-BH₃-AZTMP-terminated and α -(R_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers (Figure 3). The results obtained in the presence of PPI revealed only subtle differences between the RTs, although the efficiency of the rescue reaction was two- to tenfold reduced in mutants lacking the aromatic side-chain at position 215 (i.e. SS_Y215N, SS_Y215S and SS_Y215T). All of the results shown in Figure 4 were obtained with the mixture of α -BH₃-d4TMP diastereoisomers. Time courses obtained with SS RT, SS_2S0S and BH10_SSSY, and the corresponding R_p or S_p diastereoisomers of the inhibitor did not reveal significant differences that could be attributed to the chirality of the α -phosphate (data not shown).

Rescue reactions can be inhibited by the next complementary nucleotide. Reactions involving the excision of d4TMP are more sensitive to inhibition than those affecting AZTMP-terminated primers. However, we showed that under our assay conditions, the IC₅₀ value for the next complementary dNTP is not largely affected by RT mutations.³⁰ The introduction of a BH₃ group in AZTTP or d4TTP

had relatively minor effects on the formation of a "dead-end complex" (Table 2). Efficient inhibition of the rescue reactions on primers terminated with d4TMP analogues were obtained with dNTP concentrations in the range of 9.4 μ M to 29.8 μ M, while in most cases, the concentrations required to inhibit excision of AZTMP analogues were above 0.4 mM. Small but significant differences were observed between α -(S_p)-BH₃-AZTMP and α -(R_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers. While those blocked upon incorporation of the S_p diastereoisomer of α -BH₃-AZTTP gave values similar to those obtained with AZTMP-terminated primers, rescue reactions with the corresponding R_p diastereoisomer were around twofold more sensitive to dNTP inhibition.

Excision reactions of primers blocked with phosphorothioate derivatives of AZT

The 3'-azido-3'-deoxythymidine-5'-O-(1-thio-triphosphate) (AZTTP α S) was found to be a good substrate of HIV-1 RT. This compound is commercially available as a mixture of S_p and R_p diastereoisomers. Commercial samples of AZTTP α S contained a 2:1 ratio of the S_p relative to the R_p diastereoisomer. Both diastereoisomers were separated by HPLC and used as substrates of the DNA polymerization reaction. As shown in Figure 5(a), the S_p derivative is a good substrate of the incorporation reaction. Unlike in the case of other polymerases, such as the *Taq* DNA polymerase, HIV-1 RT is able to incorporate the R_p diastereoisomer, although with lower efficiency (2.5- to fivefold reduced catalytic rate in comparison with the S_p isomer). In order to measure the effects of introducing a phosphorothioate bond at the chain-terminating nucleotide on the ATP-mediated excision reaction, we carried out assays with the SS RT, where the DNA chain was blocked with the S_p or R_p diastereoisomers of AZTTP α S and then rescued in the presence of ATP or PPI. The results shown in Figure 5(b) reveal that chain-terminated primers with such a modification are poor substrates of the ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT, and are also very slowly excised in the presence of PPI, in comparison with the AZTMP-terminated primers. The reduced PPI-dependent phosphorolytic activity observed with phosphorothioate-terminated primers was also detected with the wild-type BH10 RT, which showed reaction kinetics similar to those observed with the SS RT (data not shown), in agreement with reported data.²⁷ In all cases, resistance to ATP and PPI-dependent phosphorolysis was more pronounced upon incorporation of the S_p diastereoisomer of AZTTP α S (Figure 5(b)).

Discussion

Despite the recent success of antiretroviral combination therapy, the development of drug

Table 2. Ability of the next complementary dNTP to inhibit ATP or PPi-mediated primer rescue by wild-type BH10 and SS RTs

Terminating nucleotide analogue	IC ₅₀ for the next dNTP (μM) ^a			
	ATP-dependent excision		PPi-dependent excision	
	BH10 RT	SS RT	BH10 RT	SS RT
α-(S _p)-BH ₃ -AZTMP	116.6 ± 32.3	308.2 ± 114.7	> 500 (37.2) ^b	439.5 ± 34.4
α-(R _p)-BH ₃ -AZTMP	247.4 ± 109.7	> 500 (59.7)	> 500 (47.6)	> 500 (40.6)
AZTMP	N.D. ^c	> 500	410 ± 43	> 500
α-(S _p)-BH ₃ -d4TMP	N.D.	9.4 ± 1.3	29.8 ± 8.6	19.5 ± 6.0
α-(R _p)-BH ₃ -d4TMP	N.D.	11.2 ± 1.5	26.7 ± 4.1	22.9 ± 2.5
d4TMP ^d	N.D.	10.1 ± 1.8	18.0 ± 1.9	14.7 ± 1.5

^a Assays were carried out in the presence of 3.2 mM ATP or 200 μM PPi. All dNTPs in these assays were supplied at 100 μM, except for dATP whose concentration ranged from 1 μM to 800 μM, depending on the assay. Active enzyme concentrations in these assays were in the range of 10–20 nM, and the concentration of the template–primer was 30 nM. Samples were incubated for 0–15 minutes depending on the assay. In all cases, incubation times were within the linear range of the corresponding time course. The percent inhibition was plotted against the concentration of dATP, and the data were fitted to a hyperbola to obtain the IC₅₀ for each enzyme. Reported values were obtained from two to seven experiments and are given in means ± standard deviations.

^b Numbers in parenthesis indicate the percent inhibition at 800 μM dATP.

^c N.D., not determined due to the low efficiency of the excision reaction.

^d Reported values for d4T-terminated primers were taken from Matamoros *et al.*³⁰

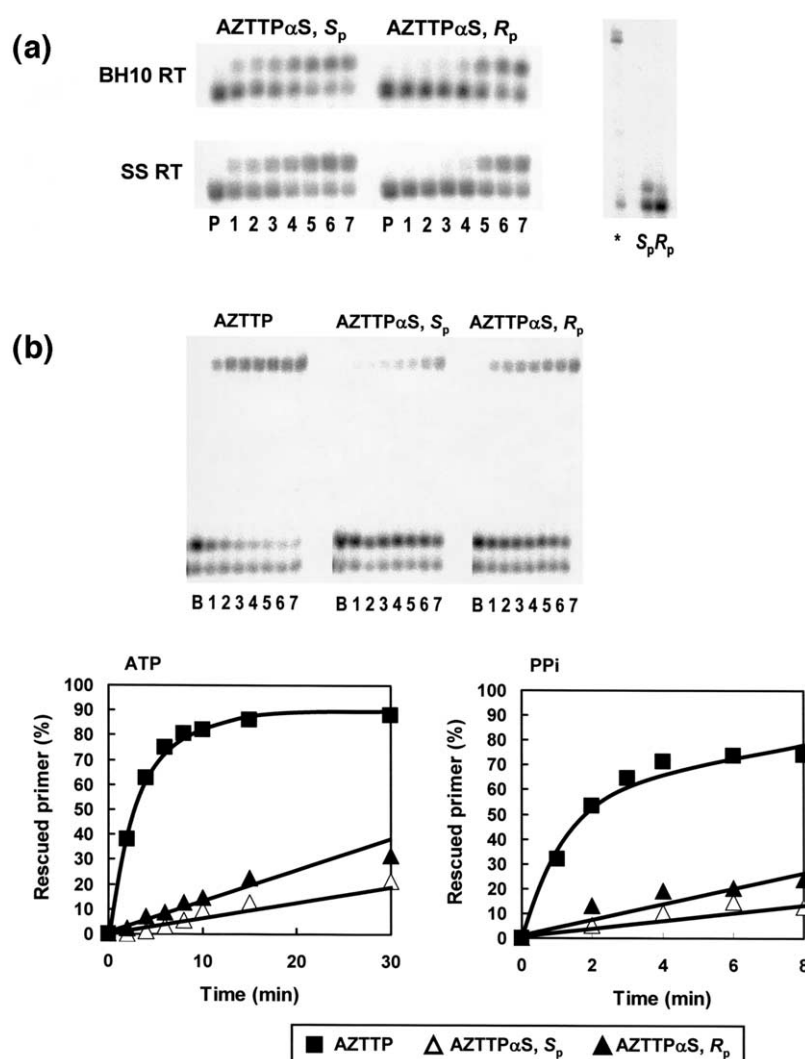


Figure 5. Incorporation of AZTT-PαS diastereoisomers and rescue DNA polymerization initiated from primers terminated with phosphorothioate derivatives of AZT. (a) Time courses of the incorporation reactions of the S_p and R_p diastereoisomers of AZTTPαS carried out with wild-type BH10 and SS RTs (left panels). Lane P represents the 25 nucleotide primer 25PGA, and lanes 1–7 correspond to aliquots of the incorporation reaction removed after 10, 20, 30 s; 1, 5, 15 and 30 minutes. The control experiment on the left shows the elongation of 25PGA by *Taq* DNA polymerase (Ampli-Taq; Applied Biosystems). Full extension (*) and one-nucleotide additions of AZTT-PαS diastereoisomers, obtained after 30 minutes incubation with five units of the enzyme, in 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), containing 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 100 μM of each dNTP, or 25 μM of the corresponding AZTTPαS isomer. (b) SS RT-catalyzed rescue reactions, carried out with primers terminated with AZT derivatives. Incorporated derivatives are shown above. Lanes P and B represent the primer before and after treatment with the inhibitor. The time course of the reaction is shown in lanes 1 to 7 which correspond to aliquots removed 2, 4, 6, 8, 10, 15 and 30 minutes after addition of 3.2 mM ATP. The time courses obtained for ATP- and PPi-mediated excision reactions are shown below.

resistance remains a major cause of anti-retroviral treatment failure. It has been estimated that 0.5%–2.7% of patients failing antiretroviral therapy are infected by HIV-1 harboring an insertion of two amino acid residues between codons 69 and 70 of the viral RT.^{31–35} The most frequently found insertions are Ser-Gly, Ser-Ser, and Ser-Ala, which are usually associated with the substitution of Thr69 by Ser, plus additional mutations related to drug resistance, including TAMs such as M41L, K70R, L210W, and T215Y/F.³⁰ The SS RT used in our studies is a prototype of this type of multi-drug-resistant RTs. Apart from T69S and the dipeptide insertion, it contains a series of mutations associated with drug resistance, such as M41L, A62V, K70R, V108I, V118I, Y181C, M184I, L210W and T215Y. Recombinant viruses containing the SS RT are resistant to AZT and d4T in phenotypic assays.^{15,30,36} Phenotypic resistance correlates with increased ATP-mediated excision activity, which is largely dependent on the presence of Tyr at position 215.³⁰

Recently, nucleoside boranophosphates have attracted great interest as a new type of nucleoside analogue. Biochemical studies showed that the substitution of a BH₃ group for an oxygen yielding an α -(R_p)-phosphate actually enhances the rate of phosphorylation by nucleoside diphosphate kinase and makes the product a more efficient RT inhibitor.²⁶ Our pre-steady-state kinetic analysis reveals that both wild-type BH10 and SS RTs can incorporate the R_p and S_p diastereoisomers of α -BH₃-AZTTP. However, they display a much higher catalytic efficiency (k_{pol}/K_d) of incorporation of the R_p diastereoisomer in comparison with the S_p diastereoisomer. Both rate constant and binding affinity are significantly reduced for the S_p diastereoisomer, yielding a 65 to 80-fold difference for the R_p diastereoisomer. The presence of the BH₃ group in clinically relevant nucleotides is known to increase the k_{pol} value of incorporation of the R_p diastereoisomer without affecting its binding to the RT active site.^{23,24} For borano derivatives of AZTTP, d4TTP, ddTTP and 3TCTP, this large increase of k_{pol} value suppresses drug resistance mediated by single amino acid substitutions such as K65R, Q151M, or M184V, or by multiple changes (i.e. A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M).^{23–25} In the case of SS RT, we observed a 3.5-fold increase in the k_{pol} value of incorporation of α -(R_p)-BH₃-AZTTP relative to AZTTP, while this effect was reduced by twofold in the wild-type BH10 RT. However, BH10 and SS RTs displayed similar nucleotide selectivity values for discrimination between AZTTP and dTTP, in agreement with our previous reports based on steady-state kinetic analysis.¹⁵ The introduction of the BH₃ group in the α -phosphate of AZTTP did not produce large differences in nucleotide selectivity between both enzymes.

Resistance to AZTTP and d4TTP displayed by SS RT is mediated by its high ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with thymidine analogues,^{15,16} leading to the formation

of a dinucleoside polyphosphate.³⁷ This activity does not involve the hydrolysis of β,γ -phosphodiester bonds, since non-hydrolyzable ATP analogues (i.e. α,β -methylene ATP; β,γ -methylene ATP or AppNHP) could serve as substrates of the phosphorolytic reaction³⁷ (this work). However, the oxygen atoms bound to the γ -phosphate of ATP appear to play an important role in the reaction. The substitution of a sulfur atom for an oxygen, as occurs in ATP γ S leads to a twofold reduction in the ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT. This effect was observed not only with primers terminated with AZT, but also with those blocked with borano derivatives of the nucleotide analogue.

The presence of the BH₃ group did not have a significant impact on the ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT. Both α -(S_p)-BH₃-AZTMP and α -(R_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers were efficiently rescued by SS RT in the presence of ATP. Interestingly, the wild-type BH10 RT also showed ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with α -(S_p)-BH₃-AZTMP or α -(R_p)-BH₃-AZTMP. Boranophosphates retain the same net charge as phosphodiester, with BH₃ and O being isoelectronic. However, the charge density within the BH₃ group vary relative to an oxygen atom.³⁸ In addition, the BH₃ group does not form classical hydrogen bonds,^{39,40} and does not coordinate metal ions.³⁸ Molecular modeling studies based on the ternary complex of HIV-1 RT complexed with a template-primer and dTTP⁴¹ showed that the substitution of the BH₃ group for an oxygen atom in the α -phosphate of the incoming dNTP affects Mg²⁺ coordination, when the S_p diastereoisomer is considered. Mg²⁺ is coordinated with the side-chain of catalytic residues Asp110 and Asp185, as well as with one oxygen atom bound to the γ -phosphate (Figure 6(a)). In contrast, the R_p diastereoisomer points away from the catalytic residues, and the only amino acid residue in the close vicinity of the BH₃ group is Arg72, with Lys65 and Lys66 being at around 6–7 Å of the BH₃ group. Arg72 is part of the nucleotide binding site, with its side-chain making hydrogen bonds with the incoming dNTP. However, it has been shown that this residue is dispensable when the BH₃ group is present.²⁵

Based on structural data, a model has been proposed to explain the molecular mechanism involved in the ATP-mediated excision reaction.¹³ According to this model, in a complex of RT with nucleic acid, the blocked primer terminus can occupy one of the two positions: the priming site, or “P site” (P complex) or the nucleotide-binding site, “N site” (N complex). It is believed that for excision to occur the blocked 3' end should be located in the N site⁴² (review⁴³). The crystal structure of an N complex of HIV-1 RT provided the molecular details of binding of the AZTMP-terminated primer at the N site.⁴⁴ According to this structure, the side-chains of the catalytic residues Asp110 and Asp185 would be close to the chiral phosphorous involved in the internucleotidic

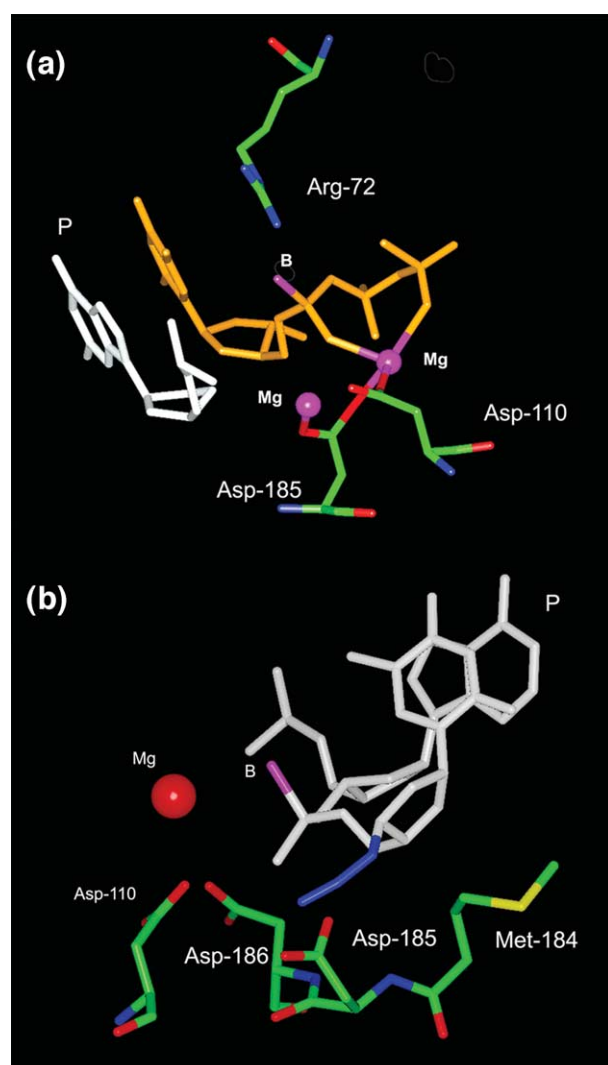


Figure 6. Models showing the position of the BH₃ group in the incoming dNTP or in an AZTMP-terminated primer in the active site of HIV-1 RT. (a) shows the location of the α -(R_p)-BH₃-dTTP (orange) in the ternary complex of HIV-1 RT/DNA-DNA/dTTP (PDB file 1RTD).⁴¹ The letter B shows the location of the BH₃ group in the R_p conformation. (b) The last two nucleotides (in white) at the 3' end of an AZTMP-terminated primer at the N site (PDB file, 1N6Q),⁴⁴ relative to the position of the aspartic acid residues forming the catalytic triad. The location of the BH₃ group in the S_p conformation (resulting from the incorporation of α -(R_p)-BH₃-AZTTP is marked with the letter B).

linkage. Modeling the BH₃ group in the S_p-diastereomeric internucleotide linkage (assuming an inversion of configuration after the incorporation of α -(R_p)-BH₃-AZTTP to the growing DNA chain) indicates that this substituent points away from the catalytic center of the DNA polymerase, and closer to residues in the fingers subdomain of HIV-1 RT (Figure 6(b)). The multi-drug-resistant SS RT does not show a preference for a specific diastereoisomer at the internucleotide linkage, with both being good

substrates of its ATP-dependent phosphorolytic activity. However, we found small but significant differences in the susceptibility to dNTP inhibition observed with primers terminated with α -(S_p)-BH₃-AZTMP or α -(R_p)-BH₃-AZTMP. Although we do not have a clear explanation for this phenomenon, the BH₃ group in α -(S_p)-BH₃-AZTMP-terminated primer points away from the catalytic site, without interfering directly or indirectly with Mg²⁺ coordination.

Primer rescue kinetics obtained with mutants of BH10 and SS RTs using primers terminated with borano derivatives of AZTMP were roughly similar to those reported for AZTMP-terminated primers.³⁰ However, there were significant differences affecting mutant SS_{2S0S}. Deletion of the dipeptide insertion between codons 69 and 70 produced a significant reduction of ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with AZTMP.^{15,30} However, this mutant was as efficient as SS RT in removing the inhibitor from α -(S_p)-BH₃-AZTMP and α -(R_p)-BH₃-AZTMP-terminated primers. Unlike in the case of AZT, the introduction of the BH₃ group in the α -phosphate of d4TTP did not have large effects on the kinetics of the primer rescue reactions catalyzed by BH10 RT, SS RT and their mutant derivatives. Kinetics were similar to those previously reported for d4TMP-terminated primers,³⁰ and susceptibility to inhibition by the next complementary dNTP was neither affected by the substitution of borane for oxygen, nor by the chirality of the phosphorous involved in the internucleotide linkage. This different behaviour observed with AZT derivatives in comparison with d4T derivatives could be related to their translocational equilibrium. In the presence of low concentrations of the next complementary dNTP, the thymidine analogue moiety of an AZTMP-terminated primer shows a preference for the N-site which is not observed, for example, with dideoxythymidine-terminated primers,⁴⁵ and probably with d4T and other chain-terminated primers whose rescue reaction is highly sensitive to dNTP inhibition.¹⁶ In the P-site, the chirality of the phosphorous involved in the internucleotide linkage should have a small influence in the kinetic properties of the RT, since oxygen substituents are relatively away from Mg²⁺ cations and catalytic residues.

Exchanging a non-bridging oxygen atom at the γ -phosphate group for sulfur caused a significant reduction of the ATP-dependent phosphorolytic activity of SS RT. This observation suggested that a phosphorothioate substitution at the 3' end of the primer could affect the excision reaction. Only the S_p diastereoisomers of nucleoside α -thiotriphosphates are good substrates of DNA polymerases, such as the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I, T7 DNA polymerase or *Taq* DNA polymerase (reviews^{28,46}). Our data show that HIV-1 RT is able to incorporate both diastereoisomers of AZTTP α S, although the incorporation rate is higher for the S_p diastereoisomer.

This observation is consistent with a preliminary report showing that the wild-type HIV-1 RT incorporates the S_p diastereoisomer with a catalytic efficiency (k_{pol}/K_d) 12 times higher than the R_p diastereoisomer.⁴⁷ It should be noted that in nucleoside phosphorothioates, the S_p isomer is equivalent to the R_p isomer of nucleoside boranophosphates, and therefore, reduced incorporation efficiencies of the R_p diastereoisomer are consistent with alterations in the coordination by Mg^{2+} at the catalytic site.

Interestingly, the incorporation of the S_p diastereoisomer by the HIV-1 RT leads to the formation of a phosphorothioate containing an R_p linkage that was found to be resistant to pyrophosphorolysis mediated by ATP, in reactions catalyzed by the SS RT.

These findings suggest a possible strategy to interfere with the excision reaction. Drugs such as nucleoside 5'-monophosphorothioate derivatives acting as chain terminators, or thioderivatives of acyclic nucleoside phosphonates (i.e. derivatives of adefovir or tenofovir) could be potentially developed to inhibit the replication of virus carrying RTs with enhanced ATP-dependent phosphorolytic activity, such as SS RT or other excision-proficient RTs. However, questions related to their intracellular delivery and toxicity need to be addressed before such compounds could be useful for *in vivo* studies.

Materials and Methods

Nucleotides and template-primers

Stock solutions (100 mM) of dNTPs and ATP, and [γ -³²P]ATP were obtained from Amersham Biosciences (presently GE Healthcare). AZTTP and d4TTP were purchased from Moravsek Biochemicals and Sierra Research, respectively. α -BH₃-AZTTP and α -BH₃-d4TTP were synthesized as described,^{48,49} and their R_p and S_p diastereoisomers were purified by reversed-phase HPLC.²⁶ AZTTP α S was obtained from TriLink BioTechnologies (San Diego, CA) and its S_p and R_p diastereoisomers were separated by reversed-phase HPLC on a Vydac C₁₈ 218TP54 column under isocratic elution conditions (5%(v/v) acetonitrile in 10 mM triethylammonium acetate buffer (pH 6.8)). The triethylammonium cation was then converted to sodium cation by passing through a sodium form cation-exchange resin Dowex 50WX8-200 (Sigma). APS was purchased from BioLog (Bremen, Germany). ATP γ S, AppNHp and β -methylene-APS were obtained from Jena Bioscience (Jena, Germany). Before use, nucleoside-triphosphates were treated with inorganic pyrophosphatase to remove traces of PPi, as described.¹⁶

DNA oligonucleotides 21P (5'-ATACTTAAACCATATG TATCC-3'), 25PGA (5'-TGGTAGGGCTATACATTCCTTG CAGG-3'), 31T (5'-TTTTTTTTTAGGATACATATGGTTA AAGTAT-3'), and D38 (5'-GGGTCCCTTCTTACCTGC AAGAATGTATAGCCCTACCA-3') were obtained from Life Technologies. Oligonucleotides 21P and 25PGA were labeled at their 5' termini with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase, and then annealed to their corresponding templates (31T and D38, respectively).

Template-primer 31T/21P was used in rapid quench experiments, while D38/25PGA was used in chain terminator excision assays.

RT expression and purification

RTs were purified as described after independent expression of their subunits (p66 and p51),^{15,30} using constructs pRT6³⁰ and pT51H.⁵¹ The 51 kDa subunit was obtained with an extension of 14 amino acid residues at its N-terminal end, which includes six consecutive histidine residues to facilitate its purification by metal chelate affinity chromatography. For those experiments requiring high concentrations of HIV-1 RT (i.e. determination of pre-steady-state kinetic parameters), RT expression and purification was performed with modified versions of plasmid p66RTB.⁵² By using this system, p66 subunits carrying a His₆ tag at the C terminus were co-expressed with the HIV-1 protease using the *E. coli* XL1 Blue strain, and the resulting p66/p51 heterodimers were purified to homogeneity by ionic exchange followed by affinity chromatography.⁵² The p66RTB-derived plasmids with the RT-coding regions of the wild-type BH10 and SS isolates were obtained after cloning the MscI-HindIII inserts purified after cleavage of pRT6-derived plasmids, at the appropriate sites of p66RTB. Before this cloning step, a DNA duplex encoding for the His₆ tag was introduced at the Sall and HindIII sites of the pRT6-derived plasmids encoding for the p66 subunit of the wild-type BH10 and SS RTs.^{15,51} For such a purpose, 20 pmol of oligonucleotides 5'-TCGACTCACCACCAC CACCACCACTGATA-3' and 5'-AGCTTATCAGTGGT GGTGGTGGTGGTGAG-3' were phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) in the presence of 1 mM ATP. Equal amounts of each oligonucleotide were then mixed, incubated at 95 °C for three minutes and slowly cooled at room temperature, to form a duplex with cohesive ends compatible with those obtained after digestion of pRT6 with Sall and HindIII. Ligations and transformations were done following standard protocols. All constructs were verified by restriction enzyme analysis and nucleotide sequencing.

Pre-steady-state kinetics of single nucleotide incorporation into DNA by HIV-1 RT

Pre-steady-state kinetic parameters for the incorporation of dTTP, AZTTP, α -(R_p)-BH₃-AZTTP and α -(S_p)-BH₃-AZTTP by WT BH10 and SS RTs were determined with a rapid quench instrument (KinTek Instruments model RQF-3) with reaction times ranging from 10 ms to 30 s. Reactions were performed by mixing a solution containing 50 nM (active sites) of HIV-1 RT and 100 nM of the template-primer 31T/21P in RT buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.05%(v/v) Triton X-100), and a variable concentration of dNTP in 6 mM MgCl₂, and quenched with 0.5 M EDTA. Reactions involving the incorporation of nucleotide analogues (i.e. AZTTP, α -(R_p)-BH₃-AZTTP and α -(S_p)-BH₃-AZTTP) were conducted with excess concentrations of enzyme (200 nM) over the template-primer duplex (100 nM). These conditions were chosen to eliminate the influence of the enzyme turnover rate (k_{ss}), which interferes in the measurements of low incorporation rates. The reaction products were separated on a 14%(w/v) polyacrylamide/8 M urea gel, and quantified using photostimulated plates and FujilMager. The formation of product (P) over time was fitted with a burst equation:

$$(P) = A \times [1 - \exp(-k_{app} \times t)] + k_{ss} \times t$$

where A is the amplitude of the burst, k_{app} is the apparent kinetic constant of formation of the phosphodiester bond, and k_{ss} is the enzyme turnover rate, i.e. the kinetic constant of the steady-state linear phase. The dependence of k_{app} on dNTP concentration is described by the hyperbolic equation:

$$k_{app} = k_{pol} \times [\text{dNTP}] / (K_d + [\text{dNTP}])$$

where K_d and k_{pol} are the equilibrium constant and the catalytic rate constant of the dNTP for RT, respectively. K_d and k_{pol} were determined from curve-fitting using Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA).

Chain terminator excision assays

RT-catalyzed DNA rescue reactions were performed with D38/25PGA DNA duplexes as described.^{16,30} Briefly, the phosphorylated template-primer (30 nM) was pre-incubated at 37 °C for ten minutes in the presence of the corresponding RT at 20–30 nM active enzyme concentration, in 50 mM Hepes buffer (pH 7.0), containing 15 mM NaCl, 15 mM magnesium acetate, 130 mM potassium acetate, 1 mM dithiothreitol, and 5% (w/v) polyethylene glycol 6000. Reactions were initiated by adding an equal amount of pre-incubation buffer containing the corresponding nucleotide analogue (i.e. AZTTP, d4TTP, α -(R_p)-BH₃-AZTTP, etc.) at a final concentration of 25 μ M. After incubating the samples at 37 °C for 30 minutes, rescue reactions were initiated by adding a mixture of all dNTPs at a final concentration of 100 μ M, in the presence of sodium PPi (200 μ M) or ATP (3.2 mM) depending on the assay. Since the next complementary dNTP (dATP, in our assay conditions) has an inhibitory effect on the rescue reaction, time-courses of the unblocking and extension reactions were carried out in the presence of 1 μ M dATP. In experiments designed to assess the inhibitory effect of dATP, extension reactions were incubated for 0–15 minutes in the presence of different concentrations of dATP. In all cases, incubation times were within the linear range of the corresponding time-course. Reactions were stopped by adding an equal amount of 10 mM EDTA in 90% (v/v) formamide containing 3 mg/ml xylene cyanol FF and 3 mg/ml bromophenol blue. Products were resolved on a denaturing 20% polyacrylamide/8 M urea gel, and primer rescue was quantified by phosphorimaging with a Bas 1500 scanner (Fuji), using the program Tina version 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Germany).

Acknowledgements

We thank Antonio Mas and Nicholas Sluis-Cremer for helpful suggestions, and Blanca M. Vázquez-Álvarez and Fernando Barahona for technical assistance. Work in Madrid was supported in part by FIPSE (grant 36207/01), by FIS through "Red de Investigación en SIDA (Red G03/173)", and by an institutional grant of Fundación Ramón Areces. Work in Marseille was supported in part by a research grant and a pre-doctoral fellowship (to J.D.) from the Agence National de Recherche sur le SIDA (ANRS). Support from the joint commission

of CNRS and CSIC through action 2002FR0024 is also acknowledged.

References

- Menéndez-Arias, L. (2002). Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 381–388.
- De Clercq, E. (2004). Antivirals and antiviral strategies. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 704–720.
- Sharma, P. L., Nurpeisov, V., Hernández-Santiago, B., Beltran, T. & Schinazi, R. F. (2004). Nucleoside inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**, 895–919.
- Otto, M. J. (2004). New nucleoside reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV infections. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 431–436.
- Deval, J., Courcambeck, J., Selmi, B., Boretto, J. & Canard, B. (2004). Structural determinants and molecular mechanisms for resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues. *Curr. Drug Metab.* **5**, 305–316.
- Menéndez-Arias, L., Matamoros, T., Deval, J. & Canard, B. (2005). Molecular mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Drug Design Rev.-On line*, **2**, 101–113.
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G. & Parniak, M. A. (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): Increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*, **37**, 15908–15917.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Mian, A. M., So, A. G. & Scott, W. A. (1999). A mechanism of AZT resistance: An increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Cell*, **4**, 35–43.
- Goldschmidt, V. & Marquet, R. (2004). Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1687–1705.
- Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W.-Y., Kojima, E., Alcaide, M. L. *et al.* (1995). Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 2398–2402.
- Ueno, T., Shirasaka, T. & Mitsuya, H. (1995). Enzymatic characterization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistant to multiple 2',3'-dideoxynucleoside 5' triphosphates. *J. Biol. Chem.* **270**, 23605–23611.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Schinazi, R. F., So, A. G. & Scott, W. A. (2000). Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3465–3472.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. & Hughes, S. H. (2001). Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J. Virol.* **75**, 4832–4842.
- Naeger, L. K., Margot, N. A. & Miller, M. D. (2002). ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2179–2184.

15. Mas, A., Parera, M., Briones, C., Soriano, V., Martínez, M. A., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (2000). Role of a dipeptide insertion between codons 69 and 70 of HIV-1 reverse transcriptase in the mechanism of AZT resistance. *EMBO J.* **19**, 5752–5761.
16. Mas, A., Vázquez-Álvarez, B. M., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (2002). Multidrug-resistant HIV-1 reverse transcriptase: involvement of ribonucleotide-dependent phosphorylation in cross-resistance to nucleoside analogue inhibitors. *J. Mol. Biol.* **323**, 181–197.
17. Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. & Hughes, S. H. (2002). Nucleoside analog resistance caused by insertions in the fingers of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involves ATP-mediated excision. *J. Virol.* **76**, 9143–9151.
18. Meyer, P. R., Lennerstrand, J., Matsuura, S. E., Larder, B. A. & Scott, W. A. (2003). Effect of dipeptide insertions between codons 69 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on primer unblocking, deoxynucleoside triphosphate inhibition, and DNA chain elongation. *J. Virol.* **77**, 3871–3877.
19. White, K. L., Chen, J. M., Margot, N. A., Wrinn, T., Petropoulos, C. J., Naeger, L. K. *et al.* (2004). Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a disinsertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 992–1003.
20. Winters, M. A., Coolley, K. L., Girard, Y. A., Levee, D. J., Hamdan, H., Shafer, R. W. *et al.* (1998). A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J. Clin. Invest.* **102**, 1769–1775.
21. Larder, B. A., Bloor, S., Kemp, S. D., Hertogs, K., Desmet, R. L., Miller, V. *et al.* (1999). A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1961–1967.
22. Lennerstrand, J., Stammers, D. K. & Larder, B. A. (2001). Biochemical mechanism of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistance to stavudine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2144–2146.
23. Selmi, B., Boretto, J., Sarfati, S. R., Guerreiro, C. & Canard, B. (2001). Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an α -boranophosphate nucleoside analogue. *J. Biol. Chem.* **276**, 48466–48472.
24. Deval, J., Selmi, B., Boretto, J., Egloff, M. P., Guerreiro, C., Sarfati, S. & Canard, B. (2002). The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using α -boranophosphate nucleoside analogues. *J. Biol. Chem.* **277**, 42097–42104.
25. Deval, J., Alvarez, K., Selmi, B., Bermond, M., Boretto, J., Guerreiro, C. *et al.* (2005). Mechanistic insights into the suppression of drug-resistance by human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase using α -boranophosphate nucleoside analogues. *J. Biol. Chem.* **280**, 3838–3846.
26. Meyer, P., Schneider, B., Sarfati, S., Deville-Bonne, D., Guerreiro, C., Boretto, J. *et al.* (2000). Structural basis for activation of α -boranophosphate nucleoside analogues targeting drug-resistant reverse transcriptase. *EMBO J.* **19**, 3520–3529.
27. Schneider, B., Meyer, P., Sarfati, S., Mulard, L., Guerreiro, C., Boretto, J. *et al.* (2001). Activation of anti-reverse transcriptase nucleoside analogs by nucleoside diphosphate kinase: improvement by α -boranophosphate substitution. *Nucleosides, Nucleotides Nucl. Acids*, **20**, 297–306.
28. Eckstein, F. (1985). Nucleoside phosphorothioates. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 367–402.
29. Hopkins, S., Furman, P. A. & Painter, G. R. (1989). Investigation of the stereochemical course of DNA synthesis catalysed by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 106–110.
30. Matamoros, T., Franco, S., Vázquez-Álvarez, B. M., Mas, A., Martínez, M. A. & Menéndez-Arias, L. (2004). Molecular determinants of multi-nucleoside analogue resistance in HIV-1 reverse transcriptases containing a dipeptide insertion in the fingers subdomain. Effect of mutations D67N and T215Y on removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA primers. *J. Biol. Chem.* **279**, 24569–24577.
31. Tamalet, C., Izopet, J., Koch, N., Fantini, J. & Yahi, N. (1998). Stable rearrangements of the β 3- β 4 hairpin loop of HIV-1 reverse transcriptase in plasma viruses from patients receiving combination therapy. *AIDS*, **12**, F161–F166.
32. Balotta, C., Violin, M., Monno, L., Bagnarelli, P., Riva, C., Facchi, G. *et al.* (2000). Prevalence of multiple dideoxynucleoside analogue resistance (MddNR) in a multicenter cohort of HIV-infected Italian patients with virological failure. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **24**, 232–240.
33. Van Vaerenbergh, K., van Laethem, K., Albert, J., Boucher, C. A. B., Clotet, B., Florida, M. *et al.* (2000). Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2109–2117.
34. Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C. *et al.* (2001). Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): Multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1836–1842.
35. Schneider, V., Legoff, J., Bélec, L., Delphin, N., Dutreuil, C., Kara-Mostefa, A. *et al.* (2004). Peptide insertions in reverse transcriptase *pol* gene of human immunodeficiency virus type 1 as a rare cause of persistent antiretroviral therapeutic failure. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 127–136.
36. Prado, J. G., Franco, S., Matamoros, T., Ruiz, L., Clotet, B., Menéndez-Arias, L. *et al.* (2004). Relative replication fitness of multi-nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains bearing a dipeptide insertion in the fingers subdomain of the reverse transcriptase and mutations at codons 67 and 215. *Virology*, **326**, 103–112.
37. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G. & Scott, W. A. (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 13471–13476.
38. Summers, J. S. & Shaw, B. R. (2001). Boranophosphates as mimics of natural phosphodiesterases in DNA. *Curr. Med. Chem.* **8**, 1147–1155.

39. Crabtree, R. H., Siegbahn, P. E. M., Eisenstein, O., Rheingold, A. L. & Koetzle, T. F. (1996). A new intermolecular interaction: unconventional hydrogen bonds with element hydride-bonds as proton acceptor. *Accts. Chem. Res.* **29**, 348–354.
40. Cramer, C. J. & Gladfelter, W. L. (1997). *Ab initio* characterization of $[(\text{H}_3\text{N})\text{BH}_3]_2$, $[(\text{H}_3\text{N})\text{AlH}_3]_2$ and $[(\text{H}_3\text{N})\text{GaH}_3]_2$. *Inorg. Chem.* **36**, 5358–5362.
41. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **282**, 1669–1675.
42. Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr, Tuske, S., Squire, C. J., Das, K., Sheng, D. *et al.* (2003). Trapping HIV-1 reverse transcriptase before and after translocation on DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 16280–16288.
43. Sarafianos, S. G., Hughes, S. H. & Arnold, E. (2004). Designing anti-AIDS drugs targeting the major mechanism of HIV-1 RT resistance to nucleoside analog drugs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1706–1715.
44. Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr, Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumaran, P. *et al.* (2002). Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J.* **21**, 6614–6624.
45. Marchand, B. & Götte, M. (2003). Site-specific footprinting reveals differences in the translocation status of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for polymerase translocation and drug resistance. *J. Biol. Chem.* **278**, 35362–35372.
46. Verma, S. & Eckstein, F. (1998). Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 99–134.
47. Sluis-Cremer, N. & Parniak, M. A. (2004). Kinetic mechanism of HIV-1 reverse transcriptase catalysed AZT excision. *Antivir. Ther.* **9**, S29.
48. He, K., Hasan, A., Krzyzanowska, B. & Shaw, B. R. (1998). Synthesis and separation of diastereomers of ribonucleoside 5'-(α -P-borano)triphosphates. *J. Org. Chem.* **63**, 5769–5773.
49. Shaw, B. R., Sergueev, D., He, K., Porter, K., Summers, J., Sergueeva, Z. & Rait, V. (1999). Boranophosphate backbone: a mimic of phosphodiester, phosphorothioates and methyl phosphonates. In *Methods in Enzymology 313, Part A, Antisense Technology* (Phillips, M. I., ed.), pp. 226–257, Academic Press, Orlando.
50. Quiñones-Mateu, M. E., Soriano, V., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (1997). Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate. *Virology*, **236**, 364–373.
51. Martín-Hernández, A. M., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: role of Tyr115 in deoxynucleotide binding and misinsertion fidelity of DNA synthesis. *EMBO J.* **15**, 4434–4442.
52. Boretto, J., Longhi, S., Navarro, J.-M., Selmi, B., Sire, J. & Canard, B. (2001). An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Anal. Biochem.* **292**, 139–147.

Edited by J. Karn

(Received 25 February 2005; received in revised form 30 March 2005; accepted 5 April 2005)



Mechanistic Insights into the Role of Val75 of HIV-1 Reverse Transcriptase in Misinsertion and Mispair Extension Fidelity of DNA Synthesis

Tania Matamoros¹, Baek Kim² and Luis Menéndez-Arias^{1*}

¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

²Department of Microbiology and Immunology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY 14642, USA

Received 21 August 2007;
received in revised form
6 November 2007;
accepted 7 November 2007
Available online
17 November 2007

The side chain of Val75 stabilizes the fingers subdomain of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT), while its peptide backbone interacts with the single-stranded DNA template (at nucleotide +1) and with the peptide backbone of Gln151. Specific DNA polymerase activities of mutant RTs bearing amino acid substitutions at position 75 (i.e., V75A, V75F, V75I, V75L, V75M, V75S and V75T) were relatively high. Primer extension experiments carried out in the absence of one deoxy-ribonucleoside-triphosphate suggested that mutations did not affect the accuracy of the RT, except for V75A, V75F, V75I, and to a lesser extent V75T. The fidelity of RTs bearing mutations V75F and V75I increased 1.8- and 3-fold, respectively, as measured by the M13 *lacZ* forward mutation assay, while V75A showed 1.4-fold decreased accuracy. Steady- and pre-steady-state kinetics demonstrated that the increased fidelity of V75I and V75F was related to their decreased ability to extend mismatched template–primers, while misincorporation efficiencies were not significantly affected by mutations. The increased mispair extension fidelity of mutant V75I RT could be attributed to the nucleotide affinity loss, observed in reactions with mismatched template–primers. Altogether, these data suggest that Val75 interactions with the 5' template overhang are important determinants of fidelity.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: HIV; DNA polymerase; fidelity; reverse transcriptase; drug resistance

Edited by J. Karn

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) converts the viral genomic RNA to a double-stranded DNA (dsDNA) intermediate, which integrates into the host genome. RT is a multifunctional enzyme possessing RNA- and DNA-dependent DNA polymerase, RNase H, strand transfer and strand displacement activities.¹

*Corresponding author. E-mail address: lmenendez@cbm.uam.es.

Abbreviations used: HIV-1, human immunodeficiency virus type-1; RT, reverse transcriptase; dsDNA, double-stranded DNA; dNTP, deoxyribonucleoside-triphosphate; dTTP, 2'-deoxythymidine 5'-triphosphate; dATP, 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate; dCTP, 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate; dGTP, 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate.

The HIV-1 RT is a heterodimeric enzyme composed of two subunits of 66 and 51 kDa, with subdomains termed fingers, thumb, palm and connection in both subunits and an RNase H domain in the larger subunit only.^{2,3} The DNA polymerase active site resides within the palm subdomain of the larger subunit (p66), which contains the essential catalytic aspartic acid residues 110, 185 and 186.^{4,5} Other residues in their vicinity, such as Lys65, Arg72, Asp113, Ala114, Tyr115 and Gln151 are involved in the interactions with the incoming deoxyribonucleoside-triphosphate (dNTP), while Leu74, Pro157, Phe160, Tyr183 and Met184 could indirectly affect dNTP binding.³

Reverse transcription is error prone and contributes to the high genetic variability of retroviruses. Mutation rates in a single cycle of retrotranscription are in the range of 10^{-4} to 10^{-5} misincorporations per nucleotide. One of the consequences of the high mutation rates has been the emergence of drug-

resistant HIV variants. Polymerization errors can be generated either by misinsertion of an incorrect nucleotide followed by mispair extension, or by transient primer slippage.⁶ Mutational studies have shown that molecular determinants of nucleotide specificity and fidelity of DNA synthesis map within the HIV-1 RT p66 subunit, mostly in the vicinity of the dNTP binding site.^{7,8} Thus, nonconservative amino acid changes affecting Tyr115 as well as the substitutions of Ala for Arg72 or Met184 were shown to reduce the accuracy of the viral RT.^{9–13} On the other hand, several mutations affecting residues that interact with the incoming nucleotide (e.g., at positions 65, 151 and 184) increase the accuracy of the viral RT.^{10,14–17}

Structural determinants of RT fidelity are not restricted to residues close to the polymerase active site. Several amino acid substitutions affecting interactions with nucleotides –1 and –2 of the primer (e.g., F227A, M230I)^{16,18–20} or interactions with the template grip (e.g., E89K and other amino acid changes at this position),²¹ as well as amino acid changes involving residues that contact the minor groove of the template–primer (e.g., G262A, W266A) were shown to decrease the accuracy of the HIV-1 RT.²² In addition, mutations in the primer grip of the RNase H domain could also influence fidelity, as demonstrated for the murine leukaemia virus RT.²³

Another set of residues that contributes to fidelity of reverse transcription includes amino acids that interact with 5' single-stranded template overhang. According to the crystal structure of the ternary complex of HIV-1 RT•DNA/DNA•2'-deoxythymidine 5'-triphosphate (dTTP),³ residues 24–27, 30 and 61–63 pack against template nucleobases +2 and +3, with Trp24, Pro25, Lys30, Phe61 and Ile63 contributing the largest contact surface. Residues 72, 74–78 and 81 interact with the template nucleotide +1, with Leu74 and Arg78 making the largest number of contacts with the nucleotide. Several mutants affecting interactions with the single-stranded template (F61A, L74V, D76I, D76R, D76V and R78A) were found to increase fidelity of DNA synthesis, based on determinations of steady-state kinetic parameters or mutant frequencies obtained with the M13 *lacZ* forward mutation assay.^{24–28} However, most of the residues interacting with the 5' template overhang are highly conserved among HIV-1 isolates†.

Drug-resistance-related mutations at positions 62 (i.e., A62V), 74 (i.e., L74I and L74V) and 77 (i.e., F77L) are likely to emerge after treatment with nucleoside analogue RT inhibitors, although codon 75 shows the highest variability under drug pressure.^{29,30} A62V, V75I, F77L and F116Y are secondary mutations that together with Q151M confer resistance to multiple nucleoside analogues.^{31,32} V75T was related to low-level resistance to stavudine and other dideoxynucleosides³³ and V75L has been observed as a secondary mutation in HIV-1 variants resistant to quinoxaline nonnucleoside RT inhibitors.³⁴ Other

amino acid substitutions at this position (e.g., V75A, V75M and V75S) are also frequently found in patients undergoing therapy with RT inhibitors.³⁰

In this work, we have obtained a series of mutant RTs with substitutions at position 75 in order to define the role of Val75 in nucleotide specificity and fidelity of DNA synthesis. Mutant RTs with altered fidelity were identified, and kinetic parameters for nucleotide incorporation were determined under steady-state and pre-steady-state conditions. The results of misinsertion and mispair extension fidelity assays led to the identification of V75I as a substitution increasing the accuracy of the viral RT. The data were consistent with the results obtained from assays based on the inactivation of the *lacZ* gene in bacteriophage M13mp2 and support the role of the 5' single-stranded template as an important determinant of fidelity in HIV-1 RT.

Results

Effect of amino acid substitutions on DNA polymerase activity

The analysis of published crystal structures of HIV-1 RT reveals that Val75 is located at the base of the fingers subdomain, more than 16 Å away from the catalytic triad of the DNA polymerase active site. In the ternary complex of HIV-1 RT•DNA/DNA•dTTP,³ the distances between the C^α atom of Val75 and the C^α atoms of Asp110, Asp185 and Asp186 are in the range of 19.8–22.7 Å. The side chain of Val75 is directed towards the hydrophobic core of the helices of the fingers subdomain, interacting with Val60, Lys73, Phe77 and Tyr146.^{3,35} The peptide backbone of Val75 contacts the single-stranded template through interactions between its –CO– group and the nucleotide at position +1, while its –NH– group interacts with the peptide backbone of Gln151. These observations suggest that amino acid substitutions affecting the side chain of Val75 would influence the topology of the RT C^α backbone interacting with the 5' template overhang, while having an effect on nucleotide selectivity.

Table 1. Steady-state kinetic parameters for dTTP incorporation of wild-type (WT) and mutant RTs

Enzyme	k_{cat} (min ^{–1})	K_{m} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (μM ^{–1} min ^{–1})
WT	3.71±0.08	0.0579±0.009	64.07±10.05
V75A	4.30±0.18	0.156±0.038	27.56±6.81
V75F	4.87±0.15	0.219±0.045	22.23±4.62
V75I	4.10±0.15	0.153±0.045	26.80±7.94
V75L	4.67±0.21	0.153±0.041	30.52±8.29
V75M	3.72±0.06	0.115±0.012	32.35±3.41
V75S	5.49±0.21	0.133±0.034	41.28±10.67
V75T	5.29±0.19	0.168±0.043	31.49±8.14

D2-47/PG5-25 was used as the substrate. Data shown are the mean values±SD obtained from a nonlinear least-squares fit of the kinetics data of a representative experiment to the Michaelis–Menten equation. Each of the experiments was performed independently at least twice. Interassay variability was below 20%.

† <http://hivdb.stanford.edu/>

Mutant RTs containing Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Ser or Thr instead of Val75 were obtained as p66/p51 heterodimers and their DNA-dependent DNA polymerase activity was determined by using a 47/25-mer heteropolymeric template-primer and dTTP under steady-state conditions. As shown in Table 1, the introduced mutations produced moderate reductions in the catalytic efficiencies of nucleotide incorporation (measured as k_{cat}/K_m), in comparison with the wild-type enzyme. While k_{cat} values were similar for all of the mutants tested, differences in the catalytic efficiencies resulted from variations in the apparent K_m values, which were 2- to 3.8-fold higher for mutant RTs than for the wild-type enzyme.

Primer extension assays using deoxynucleotide templates and biased dNTP pools

An initial assessment of the fidelity of mutant HIV-1 RTs was obtained by using an assay that monitors primer extension in the absence of one dNTP

complementary to template nucleotides. Under these conditions, the elongation of the primer past a template nucleotide complementary to the excluded dNTP requires the insertion of an incorrect nucleotide and further extension of the generated mismatch primer. The results obtained using template-primer D2-47/PG5-25 are given in Fig. 1. Full primer extensions were obtained with mutant and wild-type RTs when all required dNTPs were present in the reaction. Extension efficiencies were similar for the wild-type enzyme and for mutants V75L, V75M and V75S in all reactions. However, different band patterns were observed with mutants V75A, V75F, V75I and V75T. In the absence of 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP), the amount of fully extended primers accumulated in reactions catalyzed by V75A RT appears to be larger than in reactions catalyzed by the wild-type RT (Fig. 1), particularly after long incubation times (e.g., compare the intensities of the corresponding smears with those of bands at position +7 for mutant and wild-

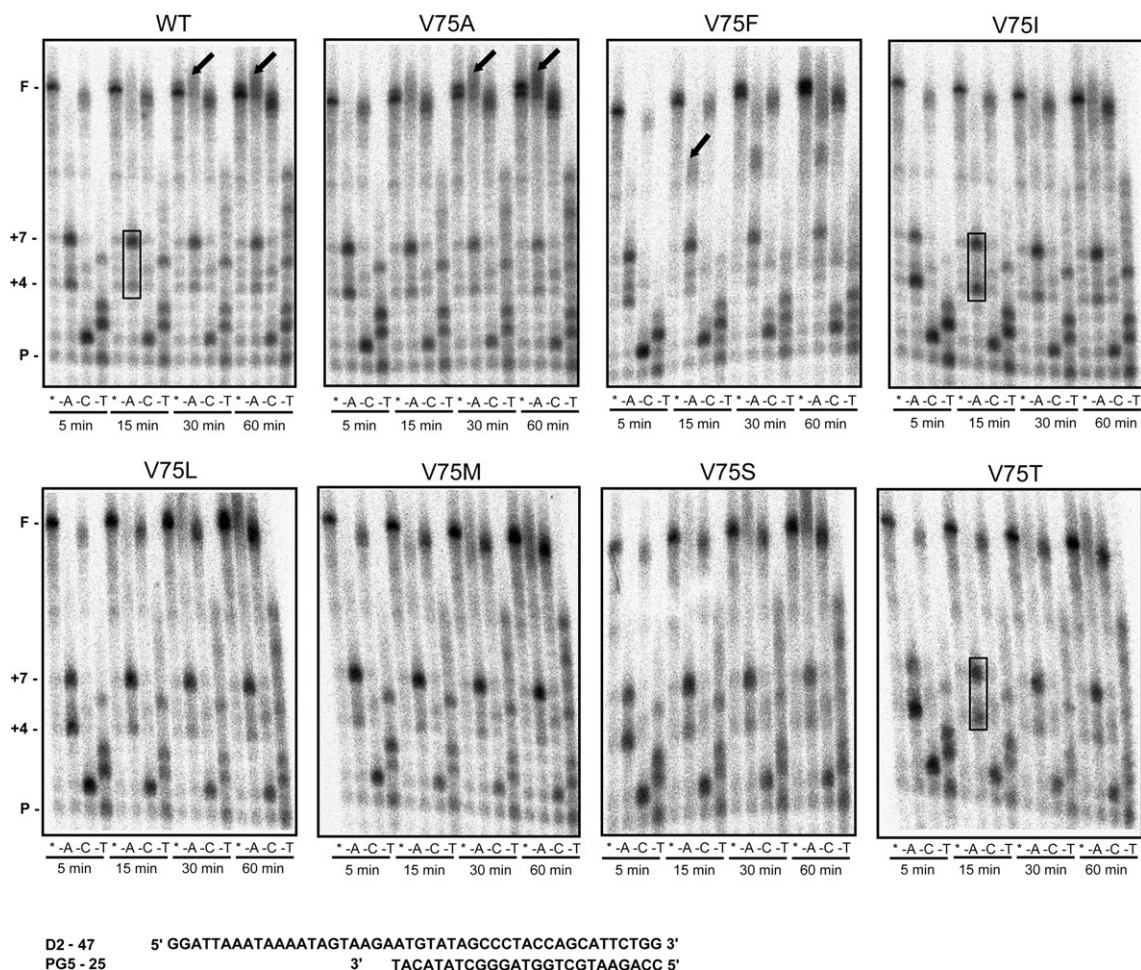


Fig. 1. Primer extension by wild-type and mutant RTs in assays containing a DNA template (D2-47) and lacking a complementary dNTP. Reactions were incubated for 5, 15, 30 and 60 min, as shown. Lanes marked with an asterisk indicate that all three nucleotides are included in the dNTP mix. The lanes marked with -A, -C and -T represent the missing nucleotide from the dNTP mix in the respective set of experiments. P and F indicate the positions of the unextended primer and the fully extended products, respectively. Prominent bands at positions +4 and +7 represent stop sites occurring after the incorporation of 4 and 7 nucleotides, respectively. Arrows are used to indicate bands representing specific stops produced by Val75 mutants. Boxes are used to highlight the differences between the wild-type RT and mutants V75I and V75T.

type RTs). In contrast, the products generated by V75F, V75I and V75T under those conditions were shorter. In comparison with the wild-type RT, there was a slower accumulation of fully extended products in reactions catalyzed by V75F (see arrows in Fig. 1). This effect was also observed with mutants V75I and V75T, although in this case the most significant differences between mutants and wild-type RT were detected in reactions incubated during 5 or 15 min, by comparing the relative intensities of bands +4 and +7. Taken together, these results were taken as preliminary evidence suggesting that V75F, V75I and V75T RTs were more faithful than the wild-type enzyme, while V75A conferred reduced fidelity of DNA synthesis.

Steady-state fidelity assays

Misinsertion and mispair extension fidelity assays were used to estimate the accuracy of DNA polymerization catalyzed by the wild-type RT and mutants V75A, V75F and V75I. Steady-state kinetic parameters for the incorporation of nucleotides at the 3' end of the primer were obtained with the heteropolymeric template-primer D2-47/PG5-25. Misinsertion fidelity assays involved kinetics measurements for the incorporation of a correct (T) or an incorrect (A, C or G) nucleotide at the 3' end of the primer; the kinetic parameters, k_{cat} and K_m , are given in Table 2. All tested RTs misinserted 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) and 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (dGTP) with the highest efficiency, whereas there was hardly any extension in the presence of dATP. Misinsertion ratios determined as the ratio of the catalytic efficiencies of incorporation of an incorrect dNTP relative to the correct dTTP were in the range from 3.1×10^{-5} to 1.8×10^{-4} . In general, these values were some-

what higher for the mutants than for the wild-type RT, although the largest differences were obtained with the mutant V75A, which showed a 5.8-fold higher misinsertion efficiency of dCTP incorporation in comparison with the wild-type enzyme.

The kinetics of mispair extension were studied for correctly matched base pairs A:T and for mismatches A:C, A:G and A:A, using the template-primer D2-47/PG5-25 and its corresponding derivatives having primers PG5-25C, PG5-25G and PG5-25A, respectively. In all cases, we measured the incorporation of a correct T opposite A at the 3' end of the primer. The results are shown in Table 3. Wild-type RT and the mutant V75A showed relatively small differences in their catalytic constants, although extension efficiencies of A:G and A:A mispairs were around two to three times higher for the mutant than for the wild-type enzyme. These data were in agreement with the lower fidelity displayed by V75A in misincorporation assays. In contrast, mutants V75I and V75F showed mismatch extension ratios that were around three to five times smaller than those obtained with the wild-type RT. These effects were observed with all three mispairs tested and could be largely attributed to the larger increases in the apparent K_m values obtained in dTTP incorporation reactions of mismatched template-primers (Table 3).

Pre-steady-state kinetic analysis of correct and incorrect nucleotide incorporation on matched template-primers

Under the steady-state conditions used, $K_m = K_d$ ($k_{\text{off}}/k_{\text{pol}}$).³⁶ Therefore, the steady-state parameters reported above do not allow for the precise determination of either the K_d for the incoming dNTP or the rate constant of nucleotide incorporation, k_{pol} ,

Table 2. Steady-state misinsertion fidelity of WT and mutant RTs, as obtained using the template primer D2-47/PG5-25

Enzyme	Nucleotide	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Misinsertion ratio f_{ins} ^a
WT	dTTP	3.71 ± 0.08	0.0579 ± 0.009	64.07 ± 10.05	
	dCTP	1.50 ± 0.09	755 ± 135	$(1.99 \pm 0.37) \times 10^{-3}$	3.10×10^{-5}
	dGTP	1.54 ± 0.11	542 ± 136	$(2.84 \pm 0.74) \times 10^{-3}$	4.43×10^{-5}
	dATP	$(7.3 \pm 0.9) \times 10^{-3}$	ND ^b	ND	ND
V75A	dTTP	4.30 ± 0.18	0.156 ± 0.038	27.56 ± 6.81	
	dCTP	1.49 ± 0.10	298 ± 72	$(5.00 \pm 1.25) \times 10^{-3}$	1.81×10^{-4}
	dGTP	1.19 ± 0.08	305 ± 97	$(3.90 \pm 1.27) \times 10^{-3}$	1.41×10^{-4}
	dATP	$(11.1 \pm 0.6) \times 10^{-3}$	ND	ND	ND
V75F	dTTP	4.87 ± 0.15	0.219 ± 0.045	22.23 ± 4.62	
	dCTP	0.85 ± 0.08	711 ± 292	$(1.19 \pm 0.50) \times 10^{-3}$	5.35×10^{-5}
	dGTP	1.27 ± 0.08	486 ± 133	$(2.61 \pm 1.58) \times 10^{-3}$	1.17×10^{-4}
	dATP	ND	ND	ND	ND
V75I	dTTP	4.10 ± 0.15	0.153 ± 0.045	26.80 ± 7.94	
	dCTP	1.30 ± 0.25	882 ± 145	$(1.47 \pm 0.37) \times 10^{-3}$	5.48×10^{-5}
	dGTP	2.10 ± 0.43	808 ± 146	$(2.59 \pm 0.71) \times 10^{-3}$	9.66×10^{-5}
	dATP	$(5.8 \pm 0.9) \times 10^{-3}$	ND	ND	ND

After formation of the RT-DNA/DNA complex, D2-47/PG5-25 elongation reactions were incubated at 37 °C for 20 s for dTTP, 45–90 s for dCTP and dGTP, and 60 min for dATP. Data shown are the mean values \pm SD, obtained from a nonlinear least-squares fit of the kinetics data of a representative experiment to the Michaelis–Menten equation. Each of the assays was performed independently at least three times. Interassay variability of the kinetic parameters was below 20%.

^a $f_{\text{ins}} = [k_{\text{cat}}(\text{incorrect})/K_m(\text{incorrect})]/[k_{\text{cat}}(\text{correct})/K_m(\text{correct})]$, where incorrect nucleotides were dCTP, dGTP, or dATP, while the correct nucleotide was dTTP.

^b ND, not determined.

Table 3. Steady-state mispair extension fidelity of WT and mutant RTs, as obtained using template primer D2-47/PG5-25

Enzyme	Base pair at the 3' end ^a	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ min ⁻¹)	Mismatch extension ratio f_{ext}^b
WT	A:C	4.41±0.12	2.77±0.46	1.592±0.268	0.025
	A:G	0.113±0.007	75.8±20.1	(1.49±0.40)×10 ⁻³	2.32×10 ⁻⁵
	A:A	0.081±0.005	62.7±14.4	(1.29±0.31)×10 ⁻³	2.01×10 ⁻⁵
V75A	A:C	4.35±0.14	5.67±0.72	0.767±0.100	0.028
	A:G	0.155±0.006	80.1±14.4	(1.94±0.36)×10 ⁻³	7.04×10 ⁻⁵
	A:A	0.071±0.004	51.3±12.1	(1.38±0.34)×10 ⁻³	5.00×10 ⁻⁵
V75F	A:C	5.90±0.37	37.6±8.7	0.156±0.038	7.02×10 ⁻³
	A:G	0.051±0.005	368±131	(1.39±0.51)×10 ⁻⁴	6.25×10 ⁻⁶
	A:A	0.041±0.003	282±74	(1.45±0.39)×10 ⁻⁴	6.52×10 ⁻⁶
V75I	A:C	4.26±0.21	32.3±6.5	0.132±0.027	4.93×10 ⁻³
	A:G	0.076±0.003	374±44	(2.03±0.25)×10 ⁻⁴	7.57×10 ⁻⁶
	A:A	0.055±0.005	342±95	(1.61±0.47)×10 ⁻⁴	6.01×10 ⁻⁶

After formation of the RT-DNA/DNA complex, mispair extension reactions were incubated at 37 °C for 20 s for the elongation of A:T and A:C mispairs, and 15–40 min for A:G and A:A mispairs. In all cases, we measured the incorporation of T opposite A at position +1. Data shown are the mean values±SD, obtained from a nonlinear least-squares fit of the kinetics data of a representative experiment to the Michaelis–Menten equation. Each of the assays was performed independently at least three times. Interassay variability of the kinetic parameters was below 20%.

^a The first base corresponds to the template and the second to the primer.

^b $f_{\text{ext}} = [k_{\text{cat}}(\text{mismatched})/K_m(\text{mismatched})]/[k_{\text{cat}}(\text{matched})/K_m(\text{matched})]$.

whose values have to be obtained from pre-steady-state kinetic experiments. Representative pre-steady-state burst experiments for the incorporation of a correct nucleotide (dTTP) on the DNA–DNA template–primer 31T/21P by the wild-type RT are shown in Fig. 2a, left panel. The rate of nucleotide incorporation (k_{obs}) was determined from burst experiments carried out in the presence of different concentrations of dNTP. The biphasic nature of the burst indicates that the rate-limiting step of the catalytic cycle occurs after chemistry. The exponential bursts showed a fast phase with rates of 3–11 s⁻¹ and a slow phase (i.e., steady state) with rates as high as 0.089 s⁻¹, consistent with the k_{cat} values reported in Table 1. By analyzing the dependence of the reaction rate (k_{obs}) on dNTP concentration, we obtained a measure of both the maximum rate of dNTP incorporation (k_{pol}) and the dNTP binding affinity (K_d) after fitting the data to a hyperbolic curve (Fig. 2b, left panel). Similar experiments were also carried out with the mutant enzymes and the dTTP concentration-dependence plots are shown in Fig. 2c, left. The pre-steady-state kinetic parameters of nucleotide incorporation, k_{pol} and K_d , are given in Table 4. Catalytic efficiencies of correct nucleotide incorporation are similar for all RTs, except mutant V75F, whose k_{pol}/K_d value is lower due to decreased k_{pol} and increased K_d in comparison with the wild-type enzyme.

The kinetics of misincorporation of dCTP and dGTP into the heteroduplex DNA/DNA 31T/21-mer were determined under single-turnover conditions (Fig. 2), with the enzyme (RT, 120 nM) in slight excess of the template–primer (31T/21P, 100 nM). Elongation product formation was quantified and plotted *versus* time, and the data for each time course were fitted to a single-exponential equation to provide the rate of incorporation (Fig. 2a, centre and right panels). Kinetic parameters k_{pol} and K_d were obtained after plotting the first-order rates *versus* nucleotide concentration and fitting the data

to a hyperbola (Fig. 2b and c). Misinsertion ratios were in the range of 1.7×10^{-5} to 9.7×10^{-5} for all misincorporations tested, but differences among the mutant and wild-type RTs were relatively small. The only significant difference with the wild-type RT was observed with mutant V75I that showed a 2.6-fold reduced misinsertion ratio for the incorporation of C instead of T. As previously described by other authors,^{37,38} large reductions in the catalytic efficiencies of misincorporation of C or G opposite A were a consequence of the loss of affinity for the nucleotide binding site and the lower incorporation rates (k_{pol}), in comparison with those obtained for the incorporation of the correct nucleotide. However, it should be noted that the low k_{pol} values of nucleotide misincorporation may not reflect a true catalytic constant, since the rate of dissociation of the RT•DNA•dNTP complex is expected to be high.^{37,39} Although k_{off} values for the ternary complex were not determined, the results of nucleotide incorporation assays carried out with wild-type and mutant RTs in the presence of a DNA trap suggested that the obtained k_{pol} values for nucleotide misincorporation were largely influenced by the disruption of the RT•DNA•dNTP complex (data not shown).

Pre-steady-state kinetic analysis of nucleotide incorporation on mismatched template–primers

The kinetic parameters obtained in the misinsertion experiments described above suggested that the misinsertion step does not make a significant contribution to the fidelity differences between wild-type and mutant RTs. Therefore, we examined the pre-steady-state kinetics of mismatch extension, a step required for fixation of the mutation. In these experiments we analyzed the incorporation of dTTP (a correct nucleotide) onto three different mismatched 3' ends (G:T, G:G and G:A), using template–primers 31T/21PT, 31T/21PG and 31T/21PA,

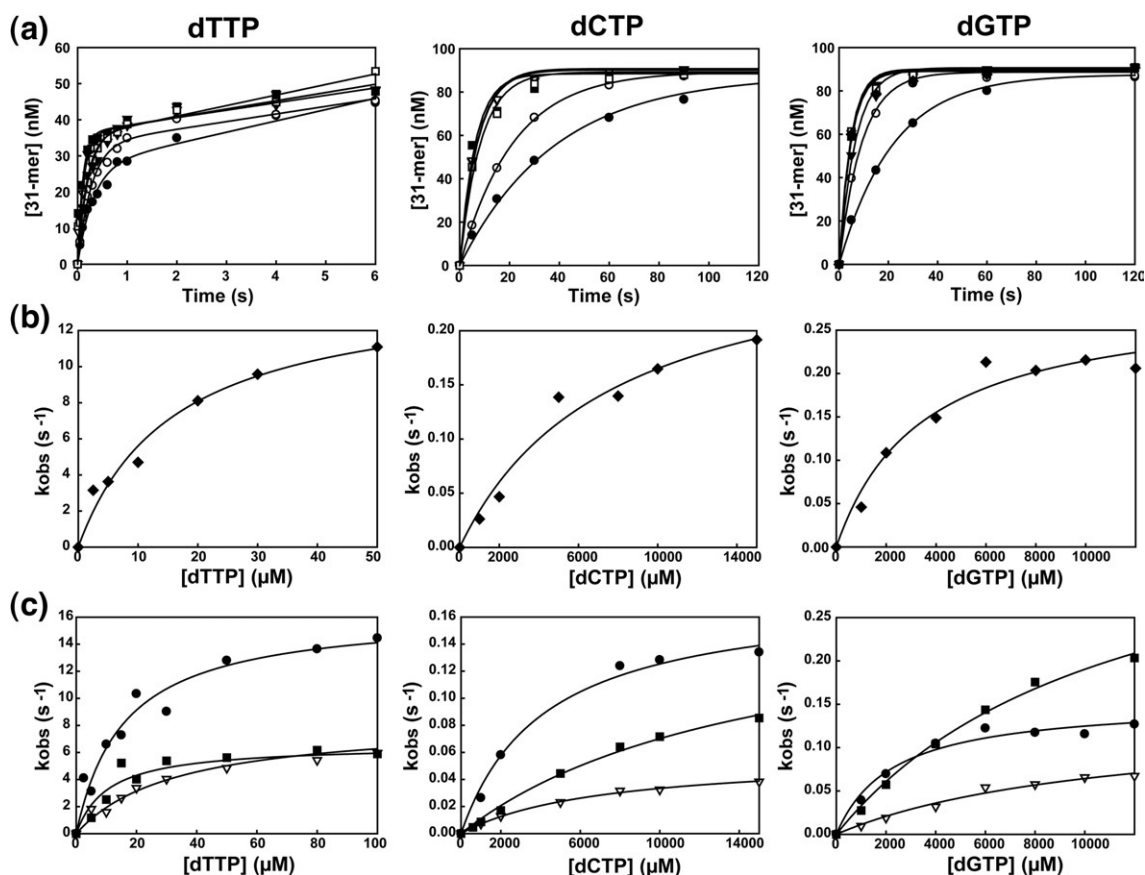


Fig. 2. Nucleotide concentration dependence on the first-order rates for correct (dTTP) or incorrect (dCTP and dGTP) incorporation into DNA/DNA 31/21-mer. (a) Pre-steady-state kinetics of nucleotide incorporation by wild-type HIV-1 RT. Preincubated solutions of RT (50 nM) and [5'-³²P]31/21-mer (100 nM) were mixed with increasing concentrations of nucleotide in a buffer containing 12 mM Mg²⁺ to start the reactions. The reactions were quenched at the indicated times and analyzed in polyacrylamide gels. The continuous lines represent the best fit of the data for dTTP incorporation to the burst equation (left panel). Center and right panels show the kinetics of dCTP and dGTP incorporation under single-turnover conditions (i.e., excess of RT over template-primer). In both cases, data were fit to a single-exponential equation. (b) The first-order rates measured above were plotted against the corresponding nucleotide concentration. The data were fit to a hyperbolic equation as described under Materials and Methods. The continuous line represents the best fit of the data to the hyperbolic equation. (c) Concentration dependence of dTTP (left), dCTP (centre) or dGTP (right) incorporation into the 31T/21P template-primer by mutant RTs V75A (●), V75F (■) and V75I (▽). Incorporation rates (k_{obs}), obtained from the corresponding burst or single-exponential equations (not shown), were plotted against the nucleotide concentrations, and the data were fitted to the hyperbolic equation to obtain K_d and k_{pol} values. In all cases, kinetic parameters for correct nucleotide incorporations were determined in the presence of 12 mM Mg²⁺. Incorporation of dCTP and dGTP by mutants V75F and V75I was monitored in the presence of 18 mM Mg²⁺.

respectively. Reaction rate constants (k_{obs}) were determined under single-turnover conditions and using an excess of enzyme (120 nM) over substrate (31/21-mer, 100 nM), and then measuring the products formed at different dTTP concentrations (Fig. 3a). The plots of the first-order rate constants (k_{obs}) for nucleotide incorporation *versus* the dTTP concentrations, obtained with wild-type and mutant RTs using different mismatched-template primers are given in Fig. 3b and c, respectively. Table 5 summarizes the kinetic parameters for nucleotide incorporation on mismatched template-primers for all tested RTs. As expected, all RTs showed higher mismatched extension ratios for G:T mispairs than for G:G or G:A mispairs.

Extension of G:T mispairs by wild-type RT proceeds at a slower rate due to a 5-fold reduction

in the k_{pol} , while the K_d increases by approximately 200-fold. These data suggest that dNTP binding is responsible for the lower efficiency of G:T mispair extension. As observed in the case of nucleotide misincorporation, the lower k_{pol} values could reflect the off rates for the ternary complex RT•DNA•dNTP. Although the dissociation of the ternary complex could explain in part the lower rates of dTTP incorporation on G:T mispairs, k_{pol} values were even lower on G:G and G:A mispairs. These data would be consistent with the formation of a "dead-end" complex in the presence of G:G and G:A mispairs.^{39,40} In this scenario, the kinetics of mispair extension could reflect the sliding rate of the mismatch between the pre- and posttranslocated states.

Our results indicate that mispair extension efficiencies of the wild-type RT and the mutant V75A

Table 4. Pre-steady-state kinetic parameters of WT and mutant RTs for misincorporation

Enzyme	Nucleotide	k_{pol} (s^{-1})	K_d (μM)	k_{pol}/K_d ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Misinsertion ratio f_{ins}^a
WT	dTTP	11.57±0.49	13.40±1.88	0.863±0.126	
	dCTP	0.291±0.052	7645±2959	$(3.80\pm1.62)\times10^{-5}$	4.40×10^{-5}
	dGTP	0.289±0.032	3435±1099	$(8.40\pm2.84)\times10^{-5}$	9.73×10^{-5}
V75A	dTTP	15.23±1.45	16.30±4.96	0.934±0.298	
	dCTP	0.178±0.009	4170±734	$(4.26\pm0.78)\times10^{-5}$	4.58×10^{-5}
	dGTP	0.153±0.008	2271±446	$(6.74\pm1.37)\times10^{-5}$	7.22×10^{-5}
V75F	dTTP	8.36±0.65	33.25±6.91	0.251±0.056	
	dCTP	0.057±0.002	7067±594	$(8.06\pm0.73)\times10^{-6}$	3.22×10^{-5}
	dGTP	0.135±0.025	11006±3537	$(1.23\pm0.45)\times10^{-5}$	4.90×10^{-5}
V75I	dTTP	7.86±0.88	12.07±4.64	0.651±0.261	
	dCTP	0.175±0.023	16116±3666	$(1.08\pm0.29)\times10^{-5}$	1.66×10^{-5}
	dGTP	0.408±0.041	12741±1970	$(3.20\pm0.59)\times10^{-5}$	4.92×10^{-5}

The template–primer 31T/21P was used as the substrate. Data shown are the mean values±SD of a representative experiment. Each of the assays was performed independently at least twice. Interassay variability was below 20%.

^a $f_{\text{ins}} = [k_{\text{pol}}(\text{incorrect})/K_d(\text{incorrect})]/[k_{\text{pol}}(\text{correct})/K_d(\text{correct})]$, where incorrect nucleotides were dCTP or dGTP, while the correct nucleotide was dTTP.

were very similar. In contrast, V75F and V75I showed reduced mispair extension efficiencies. In the case of V75I, there was a 3.2-fold reduction of the G:T mismatch extension ratio, which resulted from the larger increase in the apparent K_d value (Table 5). While differences in mispair extension efficiencies between wild-type RT and mutant V75A were relatively small, V75I showed increased fidelity with all three mispairs tested in this assay. For V75F, differences were relatively small, except for G:G mispair extensions, which were elongated at a very low rate by this mutant.

M13mp2 *lacZ* forward and reversion mutation assays

The influence of amino acid substitutions affecting Val75 of HIV-1 RT on its mutation rate was assessed using an M13-based forward mutation assay with *lacZ* as a reporter gene.⁴¹ Mutations generated when the RT copies the gapped region of the *lacZ* gene in M13mp2 can be scored by the number of plaques with altered colour phenotype (pale blue or colourless) in a specific indicator strain. The mutant frequency is then calculated as the ratio of mutant to total plaques. The results shown in Table 6 revealed that the wild-type HIV-1 RT was slightly more faithful than the RT having mutation V75A. In contrast, mutant frequencies obtained with mutants V75F and V75I were 1.8 and 3.0 times smaller than those obtained with the wild-type RT. The higher fidelity conferred by the substitution of Ile for Val75 was further confirmed using an M13mp2 *lacZ* reversion mutation assay. In this assay, the template strand of the *lacZ* gene contains an amber (TGA) codon that inactivates the nonessential α -complementation activity.⁴² Polymerase errors introduced at this codon may restore the α -complementation activity, rendering blue plaques. The mutant frequency obtained with the wild-type HIV-1 RT was around 3.5 times higher than the mutant frequency determined for the mutant V75I RT (Table 6), a result broadly in agreement with

the data collected from misinsertion and mispair extension fidelity assays.

Discussion

The $\beta 3$ – $\beta 4$ hairpin loop (residues 56–77) of the fingers subdomain in the 66-kDa subunit of the HIV-1 RT undergoes a large conformational change upon dNTP binding.^{3,43} Residues in the $\beta 3$ – $\beta 4$ hairpin loop, which are often involved in nucleoside analogue resistance,^{44–46} directly contact the incoming dNTP as well as indirectly influence its binding *via* interactions with the template base. The comparison of the crystal structures of HIV-1 RT binary and ternary complexes revealed that the 5' single-stranded template gets closer to the peptide backbone of Val75 in the ternary complex (Fig. 4). Several carbon atoms within the ribose moiety of the template nucleotide at position +1 are located less than 4 Å away from the –CO– group of Val75,³ with the C1' atom at a distance of 3.44 Å (Fig. 4b). In contrast, in binary complexes of HIV-1 RT and dsDNA, there is a larger distance between the ribose moiety of template nucleotide +1 and the peptide backbone of Val75. Thus, in complexes containing a DNA duplex with an overhang of only one nucleotide (e.g., Protein Data Bank code 2HMI), the peptide backbone of Val75 is at 4.29 Å of the C5' atom of the ribose, while on average the ribose ring atoms are more than 5.5 Å away from Val75⁴⁷ (Fig. 4d). A similar topology was observed in the binary complex containing an RNA/DNA hybrid with a one-nucleotide overhang.⁴⁸ Interestingly, in an HIV-1 RT/dsDNA binary complex containing a 5' template overhang of three nucleotides, the interaction between the –NH– and –CO– groups of the peptide backbones of Val75 and Gln151 was maintained, but the –CO– group of Val75 was found to be closer to the nitrogen base of the template nucleotide +1 than to its ribose moiety⁴⁹ (Fig. 4c). Taken together, these observations suggested that Val75 plays a role in positioning the

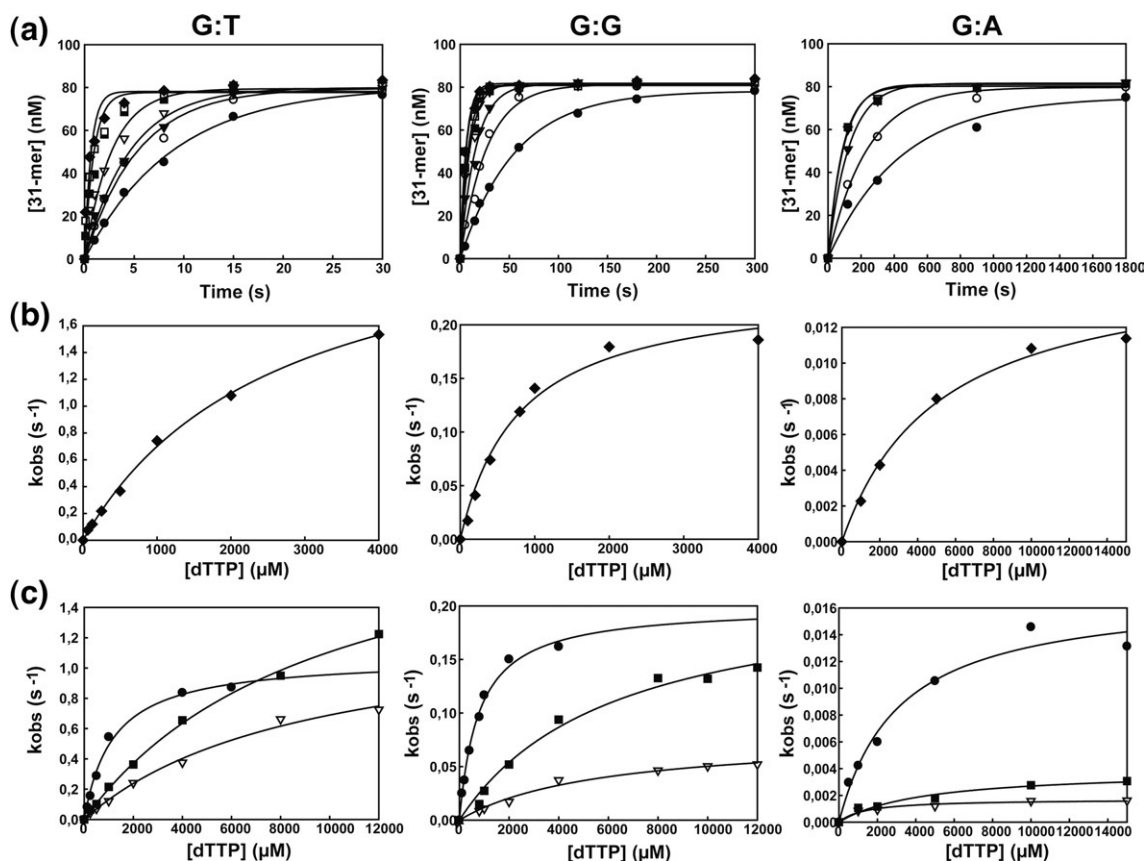


Fig. 3. Nucleotide concentration dependence on the first-order rates for dTTP incorporation into DNA/DNA 31/21-mers with G:T, G:G or G:A mismatches at their 3' end. (a) Pre-steady-state kinetics of dTTP incorporation on a mismatched template-primer by wild-type HIV-1 RT. Preincubated solutions of RT (120 nM) and [5'-³²P]31/21-mer (100 nM) were mixed with increasing concentrations of nucleotide in a buffer containing 12 mM Mg²⁺ to start the reactions. The reactions were quenched at the indicated times and analyzed in polyacrylamide gels. The continuous lines represent the best fit of the data to the single-exponential equation. (b) The first-order rates (k_{obs}) measured above were plotted against the corresponding nucleotide concentration. The data were fitted to a hyperbolic equation as described under Materials and Methods. The solid line represents the best fit of the data to the hyperbolic equation. (c) Concentration dependence of dTTP incorporation into the template-primers 31T/21PT (left), 31T/21PG (centre) and 31T/21PA (right) by mutant RTs V75A (●), V75F (■) and V75I (▽). First-order rates, obtained from the corresponding equations (not shown), were plotted against the nucleotide concentrations, and the data were fitted to the hyperbolic equation to obtain K_d and k_{pol} values. Mismatch extensions catalyzed by mutant V75A were carried out in the presence of a 12 mM Mg²⁺ concentration, while reactions performed with V75F or V75I were done in the presence of 18 mM Mg²⁺. Inhibition of the elongation reaction due to an excess of substrate was observed at dGTP concentrations above 12 mM with all RTs. This effect was not neutralized by increasing the concentration of Mg²⁺.

template nucleotide + 1 once the ternary complex is formed. In addition, the side chain of Val75 interacts with residues such as Val60, Phe77 or Tyr146, which are important to maintain the structure of the fingers subdomain while influencing the architecture of the dNTP binding site.³⁵

The mutational analysis of Val75 of HIV-1 RT has revealed that this position is rather tolerant to change, although some mutations appear to have an influence on nucleotide specificity and fidelity of DNA synthesis. Thus, substituting Ile or Phe for Val75 increased the accuracy of the polymerase, while the substitution of Ala for Val75 led to a modest but significant reduction of the enzyme's fidelity. Interestingly, those effects were consistently detected with the different types of assays used: (i) primer extensions in the absence of one dNTP, (ii) nucleotide misincorporation and mispair

extension under steady-state conditions, (iii) nucleotide misincorporation and mispair extension under pre-steady-state conditions, and (iv) M13 *lacZ*-based forward mutation assays. The largest effects were observed with mutant V75I that showed a 3-fold increased accuracy in forward mutation assays. A similar increase (3.5-fold) was also obtained with this mutant in a reversion mutation assay.

Mechanistic insights into the role of Val75 in fidelity of DNA synthesis were obtained from kinetic assays. The events leading to the fixation of a mutation involve nucleotide misincorporation, followed by extension of a mispaired template-primer.⁶⁻⁸ Kinetic parameters obtained under steady-state conditions showed that the increased fidelity of V75I and V75F was a consequence of their lower mispair extension efficiencies in

Table 5. Pre-steady-state kinetic parameters of WT and mutant RTs for mispair extension

Enzyme	Base pair at the 3' end ^a	k_{pol} (s ⁻¹)	K_d (μM)	k_{pol}/K_d (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Mismatch extension ratio f_{ext} ^b
WT	G:T	2.54±0.13	2628±252	$(9.66±1.05) \times 10^{-3}$	1.12×10^{-3}
	G:G	0.266±0.020	1014±188	$(2.62±0.52) \times 10^{-4}$	3.05×10^{-4}
	G:A	0.016±0.001	5110±755	$(3.09±0.49) \times 10^{-6}$	3.59×10^{-6}
V75A	G:T	1.07±0.05	1199±169	$(8.93±1.32) \times 10^{-4}$	9.56×10^{-4}
	G:G	0.213±0.089	853±94	$(2.50±1.08) \times 10^{-4}$	2.69×10^{-4}
	G:A	0.0172±0.002	3086±832	$(5.56±1.57) \times 10^{-6}$	5.98×10^{-6}
V75F	G:T	1.31±0.14	9076±1795	$(1.45±0.32) \times 10^{-4}$	5.78×10^{-4}
	G:G	0.084±0.009	5892±1459	$(1.42±0.39) \times 10^{-5}$	5.65×10^{-5}
	G:A	0.0017±0.0002	1372±514	$(1.24±0.49) \times 10^{-6}$	4.94×10^{-6}
V75I	G:T	2.15±0.39	9539±1571	$(2.26±0.42) \times 10^{-4}$	3.47×10^{-4}
	G:G	0.224±0.027	5888±1533	$(3.81±1.09) \times 10^{-5}$	5.86×10^{-5}
	G:A	0.0036±0.0006	3987±1632	$(0.903±0.399) \times 10^{-6}$	1.39×10^{-6}

The template–primer 31T/21P was used as the substrate. Data shown are the mean values±SD of a representative experiment. Each of the assays was performed independently at least twice. Interassay variability was below 20%.

^a The first base corresponds to the template and the second to the primer.

^b $f_{\text{ext}} = [k_{\text{pol}}(\text{mismatched})/K_d(\text{mismatched})]/[k_{\text{pol}}(\text{matched})/K_d(\text{matched})]$.

comparison with the wild-type RT. However, a mechanistic interpretation of the data based on the steady-state kinetic parameters k_{cat} and K_m is problematical because K_m differences in dNTP binding are largely governed by k_{pol} . Therefore, we performed pre-steady-state kinetic analysis on Val75 mutants in order to identify which step was affected in the process leading to the generation of a mutation. As shown in Fig. 5, in comparison with the wild-type RT, mutations conferring higher accuracy (i.e., V75I and V75F) showed significantly lower mispair extension ratios under both steady- and pre-steady-state conditions without having a large impact on misincorporation.

Interestingly, the mutant V75I showed G:T, G:G and G:A mispair extension ratios that were around three to five times lower than those obtained with the wild-type RT under pre-steady-state conditions. In comparison with the wild-type enzyme, there was a larger increase in the K_d for the correct dNTP in polymerization reactions carried out with mismatched template–primers and mutant V75I (Table 5). However, both wild-type HIV-1 RT and the mutant V75I showed similar catalytic efficiencies

for the incorporation of dTTP on matched (G:C) template–primers (Table 4) and similar catalytic constants (k_{pol}) for the incorporation of correct dNTPs on mismatched 3' ends (Table 5). Mutant V75F also showed decreased fidelity, although in this case, significant differences were observed only with G:G mispairs (Fig. 5). As in the case of V75I, the K_d for the correct nucleotide increased around five times, although V75F caused a reduction in the k_{pol} for dTTP on G:G mismatched template–primers, which was not significant for the mutant having Ile instead of Val75 (Table 5).

Although steady-state kinetic analysis has been widely used for analyzing fidelity of HIV-1 RT mutants, there are very few pre-steady-state kinetic studies dealing with the effects of mutations on fidelity of DNA synthesis. Thus, Feng and Anderson³⁸ analyzed the effects of the lamivudine-resistance mutation M184V in misinsertion fidelity assays. The authors showed that this mutation had a relatively small effect on the RT's ability to discriminate between correct and incorrect nucleotides. Similar studies carried out with the single-amino acid variants V148I and Q151N revealed only small differences in nucleotide selectivity between both mutants and the wild-type RT, although V148I and Q151N showed reduced mispair extension efficiency in comparison with the wild-type RT.⁵⁰ In the case of Q151N, this effect was largely attributed to its higher K_d for a correct nucleotide when a mismatched template–primer is used as substrate. These effects are similar to those reported here for V75I. However, the catalytic efficiency of Q151N is largely reduced in comparison with the wild-type enzyme,^{17,50} suggesting that this mutation is unlikely to appear *in vivo* due to its detrimental effect on dNTP binding. In contrast, V75I and other mutants at this position retain significant DNA polymerase activity in incorporation assays carried out under different conditions (Tables 1 and 4 and in Fig. 1).

These results were also consistent with the variability observed at Val75 *in vivo*. Mutant virus

Table 6. Accuracy of WT and mutant RTs in M13mp2 *lacZα* forward and reversion mutation assays

Enzyme	Total plaques	Mutant plaques	Mutant frequency	Fidelity (fold increase)
M13mp2 <i>lacZα</i> forward mutation assay ^a				
WT	6736	139	2.06×10^{-2}	–
V75A	5271	148	2.81×10^{-2}	0.7
V75F	6157	69	1.12×10^{-2}	1.8
V75I	6033	42	6.96×10^{-3}	3.0
M13mp2 <i>lacZα</i> reversion mutation assay				
WT	1,292,640	35	2.7×10^{-3}	–
V75I	4,059,250	32	7.8×10^{-4}	3.5

^a As a control, nucleotide sequencing of the entire 361-base-pair *lacZα* gene obtained from M13mp2 DNA isolated from five mutant colonies of each DNA synthesis reaction was performed. All colonies contained single mutations within the *lacZ* target that produced gene inactivation. Background mutant frequency for this assay was estimated to be around 5×10^{-4} .

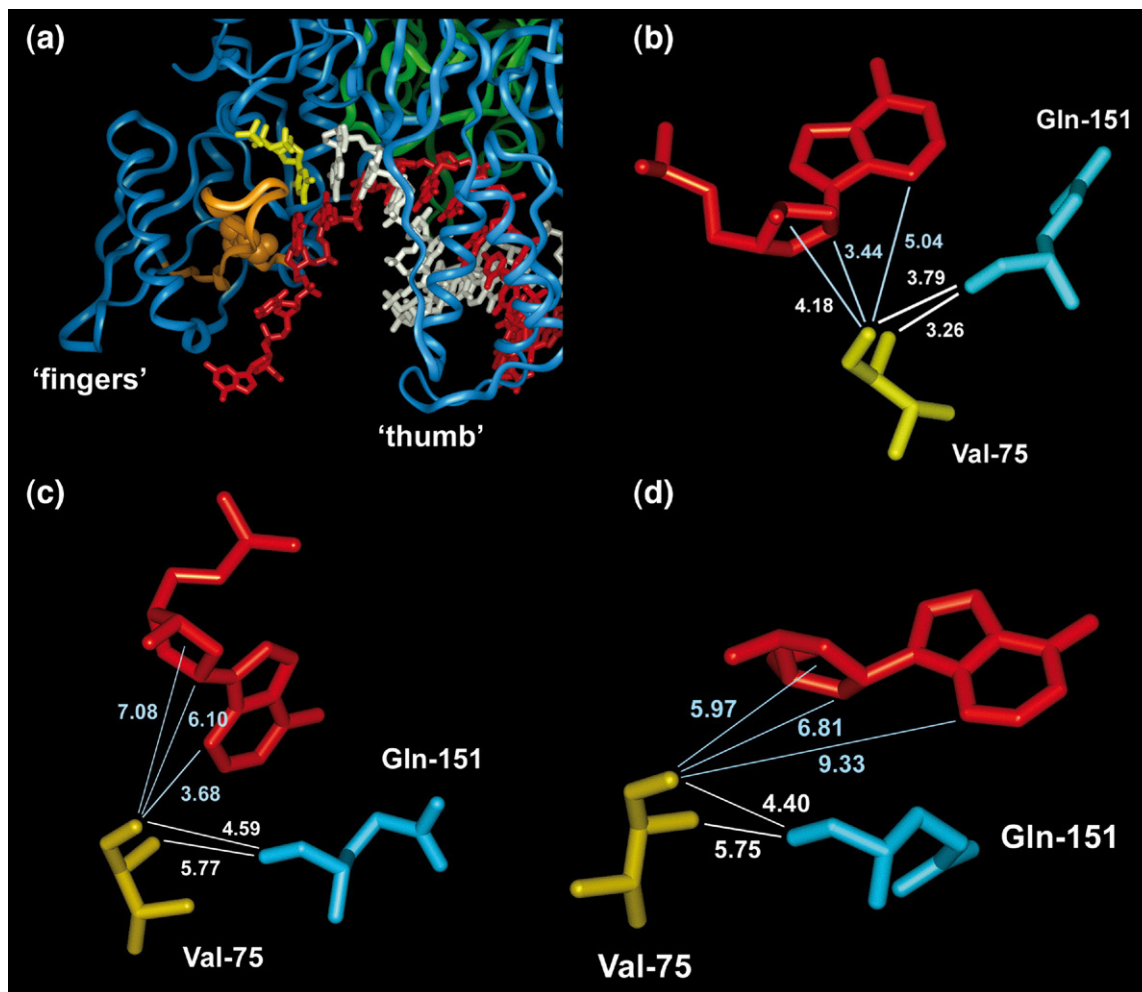


Fig. 4. Interactions between the peptide backbone of Val75 of HIV-1 RT and neighbouring residues. (a) View of the DNA polymerase site showing the location of the dsDNA template-primer (template strand in red and primer strand in white) and the incoming dNTP (yellow). Blue and green ribbon representations are used to indicate the location of the 66- and 51-kDa subunits of the RT, respectively. The $\beta 3$ - $\beta 4$ hairpin loop (shown in orange) contains Val75, which is represented with a CPK model. Location of Val75 (yellow), Gln151 (blue) and template nucleotide +1 (red) in the crystal structures of the ternary complex of HIV-1 RT•DNA/DNA•dTTP (PDB code 1RTD)³ (b), and binary complexes of HIV-1 RT and dsDNA (c and d). The structure shown in (c) (PDB code R0A) contains a 5' template overhang of three nucleotides,⁴⁸ while in (d), the single-stranded template contains just one nucleotide (PDB code 2HMI).⁴⁶ Representative intramolecular distances (in angstroms) between peptide backbone groups in Val75 and neighbouring residues are indicated. Reported distances between the -CO- group of Val75 and the template nucleotide correspond to positions N3 (nitrogen base), C1' (ribose), and the average distance to the five atoms in the ribose ring.

carrying the drug-resistance-related mutations V75I and V75T were shown to replicate efficiently in various cell types.^{35,51} V75I emerges as a secondary mutation in HIV variants resistant to multiple dideoxynucleosides^{31,32} and appeared as a compensatory mutation in virus carrying G190E, a substitution conferring resistance to several non-nucleoside RT inhibitors.^{34,52} In the case of multi-drug resistance, V75I appears together with Q151M and probably affects dNTP binding by altering the interaction of Gln151 with the nitrogen base of the incoming dNTP, as well as other interactions within the core of the fingers subdomain (e.g., with the side chain of Phe77). On the other hand, its compensatory effect in virus carrying mutation G190E could be related to the positioning of the template-primer. Although the peptide backbone

of Val75 interacts with the 5' template overhang in the ternary complex of HIV-1 RT, we cannot rule out an indirect effect on Gln151 and other residues in the dNTP binding site that could account for the observed differences in the fidelity of DNA synthesis.

Materials and Methods

Reagents

Stock solutions (100 mM) of dNTPs and [γ -³²P]ATP were obtained from GE Healthcare. DNA oligonucleotides 21P (5'-ATACTTAAACCATATGTATCC-3'), PG5-25 (5'-CCAGAAATGCTGGTAGGGCTATACAT-3'), 31T (5'-TTT-TTTTATAGGATACATATGGTTAAAGTAT-3'), and D2-47

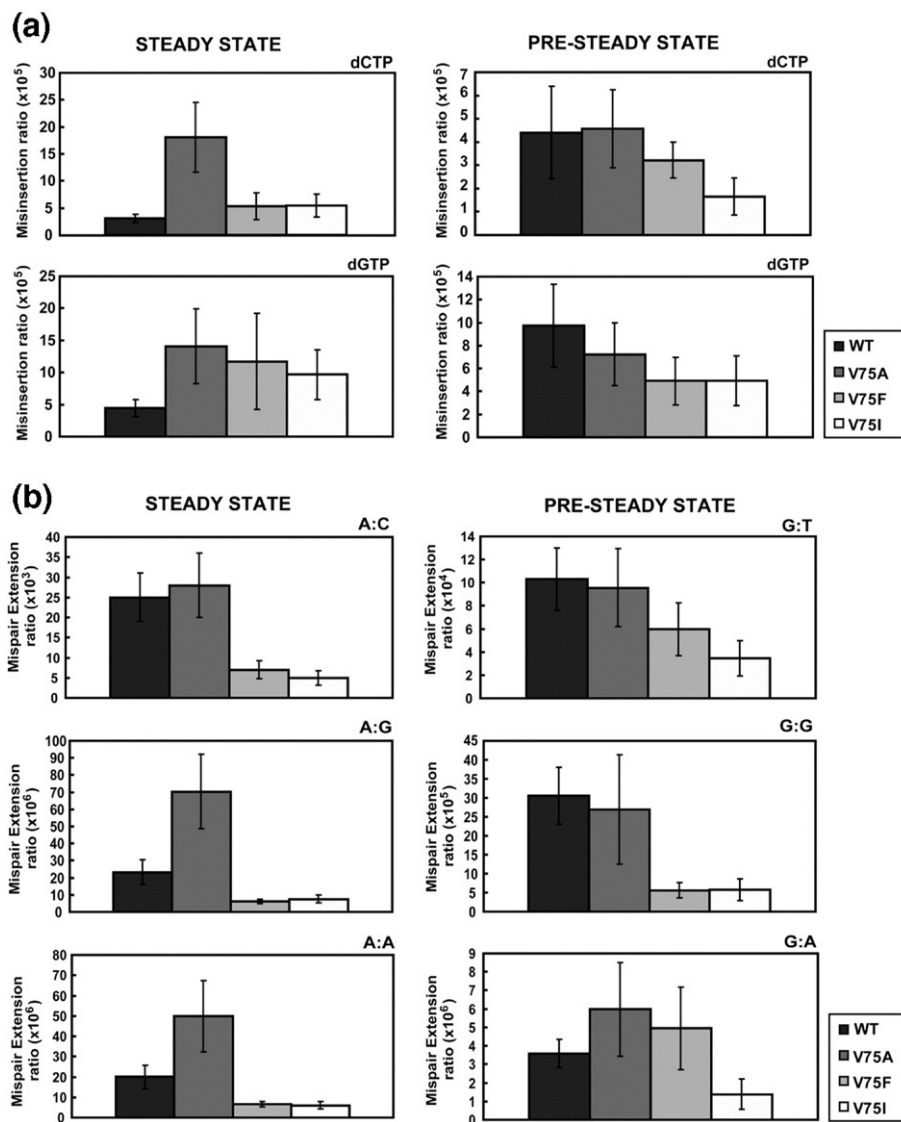


Fig. 5. Effect of RT mutations on the fidelity of DNA synthesis. Misincorporation efficiencies (a) and mispair extension efficiencies (b) for the wild-type HIV-1 RT and mutants V75A, V75F and V75I, as determined in steady-state kinetic assays (left) and in pre-steady-state kinetic assays (right).

(5'-GGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCC-TACCAGATTCTGG-3') were obtained from Life Technologies. Oligonucleotides 21P and PG5-25 were labelled at their 5' termini with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase, and then annealed to their corresponding templates (31T and D2-47, respectively). Template-primer 31T/21P was used in rapid-quench experiments, while D2-47/PG5-25 was used in steady-state kinetic assays. All other reagents were purchased from Merck or Sigma.

Phage and bacterial strains

The bacteriophage M13mp2 was used to prepare the gapped duplex DNA substrate. M13 phage was grown in the *Escherichia coli* strain NR9099 [Δ (*pro-lac*), *thi*, *ara*, *recA56/F'* (*proAB*, *lacI_q* Δ M15)] to obtain the single-stranded and replicative DNA of M13. Electrocompetent *E. coli* strain MC1061 [*hsdR*, *hsdM*+, *araD*, Δ (*ara*, *leu*), Δ (*lacI*POZY), *galU*, *galK*, *strA*] was used to generate the mutant phage. The α -complementation strain of *E. coli*, CSH50 [Δ (*pro-lac*), *thi*, *ara*, *strA/F'* (*proAB*, *lacI_q* Δ M15,

traD36)], was used to visualize the phenotype of the mutant phage.

Mutagenesis, expression and purification of recombinant RTs

Site-directed mutagenesis was carried out with the Quik-Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) by following the manufacturer's instructions, using plasmids pRT6⁵³ or p66RTB⁵⁴ as templates and the following mutagenic primers: 5'-CAGTACTAAATGGAGAAAAT-TAGCAGATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGA-AATCTGCTAATTTTCTCCATTAGTACTG-3' for V75A, 5'-CAGTACTAAATGGAGAAAATTATTCGATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGAAATCGAATAATTTTCTC-CATTAGTACTG-3' for V75F, 5'-CAGTACTAAATGGAGAAAATTAATAGATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGAAATCTATTAATTTTCTCCATTAGTACTG-3' for V75I, 5'-CAGTACTAAATGGAGAAAATTACTAG-ATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGAAATCTAG-TAATTTTCTCCATTAGTACTG-3' for V75L, 5'-

CAGTACTAAATGGAGAAAATTAATGGATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGAAATCCATTAATTTCTC-CATTTAGTACTG-3' for V75M, 5'-CAGTACTAAATGGAGAAAATTATCAGATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGAAATCTGATAATTTCTCCATTAGTACTG-3' for V75S, 5'-CAGTACTAAATGGAGAAAATTAACA-GATTTCAGAGAAC-3' and 5'-GTTCTCTGAAATCTGT-TAATTTCTCCATTAGTACTG-3' for V75T (relevant codons underlined). After mutagenesis, the RT-coding regions were sequenced. Then, inserts containing the appropriate mutations were cloned in the p51 expression vector pT51H by following previously described procedures.^{9,55}

RTs were purified as described, after independent expression of their subunits (p66 and p51),^{44,56} using the constructs derived from pRT6 and pT51H. The 51-kDa subunit was obtained with an extension of 14 amino acid residues at its N-terminal end, which includes six consecutive histidine residues to facilitate its purification by metal chelate affinity chromatography. For those experiments requiring high concentrations of HIV-1 RT (i.e., determination of pre-steady-state kinetic parameters), RT expression and purification were performed with modified versions of plasmid p66RTB⁵⁷ as previously described.⁵⁴ RT p66 subunits carrying a His₆ tag at their C-terminus were coexpressed with HIV-1 protease in *E. coli* XL1 Blue to obtain p66/p51 heterodimers, which were later purified by ionic exchange followed by affinity chromatography.^{54,57} Enzymes were quantified by active-site titration³⁷ before biochemical studies.

Extension of primers in the absence of one dNTP

The template-primer D2-47/PG5-25 was used to determine the extent of misincorporation in the absence of one dNTP. Prior to the elongation reaction, PG5-25 was labelled at its 5' terminus with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase, and annealed to the template (D2-47) in a solution containing 150 mM NaCl and 150 mM magnesium acetate.¹¹ Then, the template-primer was diluted 10-fold in 500 mM Hepes (pH 7.0) containing 150 mM NaCl and 150 mM magnesium acetate. Assays were carried out for 0 to 60 min at 37 °C with 24 nM RT, in 10 μ l of 50 mM Hepes (pH 7.0), 15 mM NaCl, 15 mM magnesium acetate, 130 mM KCH₃COO, 1 mM DTT, 5% (w/v) polyethylene glycol, and dNTPs at a concentration of 500 μ M each (*: dATP, dCTP, dTTP; -A: dCTP, dTTP; -T: dATP, dCTP; and -C: dATP, dTTP) (Fig. 1). The template-primer concentration in the assay was 22.5 nM. At the end of the incubation period, the reactions were stopped by adding 4 μ l of stop solution [10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in 90% formamide containing 3 mg/ml xylene cyanol FF and 3 mg/ml bromophenol blue] and incubated at 90 °C for 10 min. Reaction products were separated in denaturing 20% polyacrylamide/8 M urea gels and visualized by phosphorimaging with a BAS 1500 scanner (Fuji).

Steady-state kinetic assays

Fidelity assays were performed as previously described.^{58–60} Assays were carried out in 10–12 μ l of 50 mM Hepes (pH 7.0), 15 mM NaCl, 15 mM magnesium acetate, 130 mM KCH₃COO, 1 mM DTT and 5% (w/v) polyethylene glycol 6000. The template-primer used in misinsertion fidelity assays was D2-47/PG5-25. For

mispair extension fidelity assays, three additional primers were used instead of PG5-25 (i.e., PG5-25C, PG5-25G and PG5-25A). All of them were identical with PG5-25, but they had C, G, or A (instead of T), at their 3' end. Template-primer concentrations were 30 nM in all assays. Nucleotide concentrations in the range of 10 nM to 1 mM were used to measure dTTP incorporation, while incorrect dNTP concentrations ranged from 0.1 to 10 mM in the assays. For the extension of mismatched template-primers, dTTP concentrations used were in the range of 10 μ M to 5 mM. The active enzyme concentration was around 6–10 nM. The rate of product formation was measured for 10–12 different concentrations of each correct or incorrect dNTP. After incubation at 37 °C, products were heat-denatured, resolved in 20% polyacrylamide/8 M urea gels and quantified with a BAS 1500 scanner (Fuji) using the program Tina version 2.09 (Raytest Isotopenmessteigerate GmbH Staubenhardt, Germany). The catalytic constants k_{cat} and K_m were determined after fitting the elongation data to the Michaelis-Menten equation.

Pre-steady-state kinetic assays

Pre-steady-state kinetic parameters for the incorporation of dTTP by wild-type and mutant HIV-1 RTs were determined with a rapid quench instrument (model QFM-400, Bio-Logic Science Instruments, Claix, France) with reaction times ranging from 10 ms to 6 s.³⁷ Reactions were performed by mixing 12 μ l of a solution containing 50 nM (active sites) of HIV-1 RT and 100 nM of the template-primer 31T/21P in RT buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 0.05% (v/v) Triton X-100] with 12 μ l of RT buffer containing different concentrations of dNTP in the presence of 12–18 mM MgCl₂. At appropriate times, reactions were quenched with EDTA (0.3 M final concentration). For studying misinsertion and mismatched primer extension fidelity, reactions involving the incorporation of incorrect nucleotides and the mispair extension (i.e., the incorporation of dCTP and dGTP on 31T/21P or the extension of G:T, G:G and G:A mispairs) were conducted with excess concentrations of enzyme (120 nM) over the template-primer duplex (100 nM). These conditions were chosen to eliminate the influence of the enzyme turnover rate (k_{ss}), which interferes in the measurements of low incorporation rates.

For mispair extension fidelity assays,⁶¹ three additional primers were used: 21PT, 21PG and 21PA. All of them were identical with 21P, but had T, G, or A (instead of C) at their 3' terminus. Misincorporation and mispair extension reactions were performed in the buffer conditions described above, using a rapid-quench instrument. When the reaction times were longer than 8 s, the assays were carried out manually. The reaction products were separated on a 20% (w/v) polyacrylamide/8 M urea gel and quantified by phosphorimaging with a BAS 1500 scanner (Fuji). The formation of product [P] over time was fitted with the burst equation:

$$[P] = A \times [1 - \exp(-k_{obs} \times t)] + k_{ss} \times t$$

where A is the amplitude of the burst, k_{obs} is the apparent kinetic constant of formation of the phosphodiester bond, and k_{ss} is the enzyme turnover rate, i.e., the kinetic constant of the steady-state linear phase. Data from single-turnover experiments were fitted to a single-exponential equation that measures the rate of dNTP

incorporation (k_{obs}) per given dNTP concentration ([dNTP]). The dependence of k_{obs} on [dNTP] is described by the hyperbolic equation:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{pol}} \times [\text{dNTP}] / (K_d + [\text{dNTP}])$$

where K_d and k_{pol} are the equilibrium constant and the catalytic rate constant of the dNTP for RT, respectively. K_d and k_{pol} were determined from curve fitting using Sigma Plot.

M13mp2 *lacZ* forward and reversion mutation assays

Mutation frequencies for wild-type and mutant HIV-1 RTs were determined as described previously.⁴¹ M13mp2 DNA containing a single-stranded gap of 361 nucleotides was prepared as described⁴¹ and used as a template-primer for fill-in DNA synthesis reactions by wild-type and mutant RTs. In the forward mutation assay, polymerase errors that inactivate the nonessential α -complementation activity of the *lacZ* gene in bacteriophage M13mp2 are scored as light blue or colourless plaques. In this assay, mutant phenotypes can be the result of nucleotide changes at 125 different sites in the *lacZ* gene. In the reversion mutation assay, the starting DNA substrate contains an inactivating base substitution in the *lacZ* gene. Polymerase errors that restore partial or full α -complementation activity to yield a blue plaque phenotype are scored. Fill-in reactions were carried out with gapped M13mp2 DNA (50 ng), purified RT (100 nM), and the four dNTPs (250 μM each) in 10 μl of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer containing 100 mM KCl, 2 mM DTT and 4 mM MgCl_2 . Reactions were incubated for 30 min at 37 °C and then stopped by adding 1 μl of 60 mM EDTA. Complete synthesis across the gapped region was confirmed by agarose gel electrophoresis.⁴¹ Two independent gap-filling reactions were performed for RT proteins. Reaction products were introduced into *E. coli* strain MC1061 by electroporation. Transformed cells were plated to M9 plates containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside and isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside with CSH50 lawn cells. The mutation frequency was determined as the ratio of mutant plaques (light blue and colourless in the forward mutation assay, or blue in the reversion assay) to mutant plus wild-type plaques (dark blue in the forward mutation assay or colourless in the reversion assay) as described.⁴¹ The background mutation frequency was determined by electroporating unfilled gapped duplex and scoring for mutant plaques as described above.

Acknowledgements

We thank Magda Galović for excellent technical assistance. Work in Madrid was supported in part by grants of the Spanish Ministry of Education and Science (BIO2003/01175), Fondo de Investigación Sanitaria (through "Red Temática de Investigación Cooperativa en SIDA" RD06/0006), and an institutional grant of Fundación Ramón Areces. T.M. is a recipient of a predoctoral fellowship of the Spanish Ministry of Education and Science.

References

- Basavapathruni, A. & Anderson, K. S. (2007). Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J.*, doi:10.1096/fj.07-8697rev.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. & Steitz, T. A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, **256**, 1783–1790.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **282**, 1669–1675.
- Larder, B. A., Kemp, S. D. & Purifoy, D. J. M. (1989). Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 4803–4807.
- Le Grice, S. F. J., Naas, T., Wohlgensinger, B. & Schatz, O. (1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* **10**, 3905–3911.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**, 16895–16898.
- Menéndez-Arias, L. (2002). Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 91–147.
- Rezende, L. F. & Prasad, V. R. (2004). Nucleoside-analogue resistance mutations in HIV-1 RT and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1716–1734.
- Martín-Hernández, A. M., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: role of Tyr115 in deoxynucleotide binding and misinsertion fidelity of DNA synthesis. *EMBO J.* **15**, 4434–4442.
- Pandey, V. N., Kaushik, N., Rege, N., Sarafianos, S. G., Yadav, P. N. S. & Modak, M. J. (1996). Role of methionine 184 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in the polymerase function and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry*, **35**, 2168–2179.
- Martín-Hernández, A. M., Gutiérrez-Rivas, M., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (1997). Mismatch extension fidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Tyr115. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1383–1389.
- Lewis, D. A., Bebenek, K., Beard, W. A., Wilson, S. H. & Kunkel, T. A. (1999). Uniquely altered DNA replication fidelity conferred by an amino acid change in the nucleotide binding pocket of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **274**, 32924–32930.
- Cases-González, C. E., Gutiérrez-Rivas, M. & Menéndez-Arias, L. (2000). Coupling ribose selection to fidelity of DNA synthesis—the role of Tyr115 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **275**, 19759–19767.
- Wainberg, M. A., Drosopoulos, W. C., Salomon, H., Hsu, M., Borkow, G., Parniak, M. A. *et al.* (1996). Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, **271**, 1282–1285.
- Drosopoulos, W. C. & Prasad, V. R. (1998). Increased misincorporation fidelity observed for nucleoside analog resistance mutations M184V and E89G in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase does not correlate with the overall error rate measured in vitro. *J. Virol.* **72**, 4224–4230.

16. Harris, D., Kaushik, N., Pandey, P. K., Yadav, P. N. S. & Pandey, V. N. (1998). Functional analysis of amino acid residues constituting the dNTP binding pocket of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **273**, 33624–33634.
17. Weiss, K. K., Bambara, R. A. & Kim, B. (2002). Mechanistic role of residue Gln151 in error prone DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT)—pre-steady state kinetic study of the Q151N HIV-1 RT mutant with increased fidelity. *J. Biol. Chem.* **277**, 22662–22669.
18. Wisniewski, M., Palaniappan, C., Fu, Z., Le Grice, S. F. J., Fay, P. & Bambara, R. A. (1999). Mutations in the primer grip region of HIV reverse transcriptase can increase replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **274**, 28175–28184.
19. Gutiérrez-Rivas, M. & Menéndez-Arias, L. (2001). A mutation in the primer grip region of HIV-1 reverse transcriptase that confers reduced fidelity of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4963–4972.
20. Cases-González, C. E. & Menéndez-Arias, L. (2004). Increased G→A transition frequencies displayed by primer grip mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Virol.* **78**, 1012–1019.
21. Hamburg, M. E., Curr, K. A., Monaghan, M., Rao, V. R., Tripathi, S., Preston, B. D. *et al.* (2006). Structural determinants of slippage-mediated mutations by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **281**, 7421–7428.
22. Beard, W. A., Stahl, S. J., Kim, H.-R., Bebenek, K., Kumar, A., Strub, M.-P. *et al.* (1994). Structure/function studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase—alanine scanning mutagenesis of an α -helix in the thumb subdomain. *J. Biol. Chem.* **269**, 28091–28097.
23. Mbisa, J. L., Nikolenko, G. N. & Pathak, V. K. (2005). Mutations in the RNase H primer grip domain of murine leukemia virus reverse transcriptase decrease efficiency and accuracy of plus-strand DNA transfer. *J. Virol.* **79**, 419–427.
24. Rubinek, T., Bakhanashvili, M., Taube, R., Avidan, O. & Hizi, A. (1997). The fidelity of 3' misinsertion and mispair extension during RNA synthesis exhibited by two drug-resistant mutants of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 with Leu74→Val and Glu89→Gly. *Eur. J. Biochem.* **247**, 238–247.
25. Kim, B., Hathaway, T. R. & Loeb, L. A. (1998). Fidelity of mutant HIV-1 reverse transcriptases: interaction with the single-stranded template influences the accuracy of DNA synthesis. *Biochemistry*, **37**, 5831–5839.
26. Kim, B., Ayrán, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H. & Horrigan, J. (1999). New human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis: accuracy, template binding, and processivity. *J. Biol. Chem.* **274**, 27666–27673.
27. Shah, F. S., Curr, K. A., Hamburgh, M. E., Parniak, M., Mitsuya, H., Arnez, J. G. & Prasad, V. R. (2000). Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **275**, 27037–27044.
28. Fisher, T. S. & Prasad, V. R. (2002). Substitutions of Phe⁶¹ located in the vicinity of template 5'-overhang influence polymerase fidelity and nucleoside analog sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **277**, 22345–22352.
29. Menéndez-Arias, L. (2002). Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 381–388.
30. Clark, S. A., Calef, C. & Mellors, J. W. (2005). Mutations in retroviral genes associated with drug resistance. In *HIV Sequence Compendium 2005* (Leitner, T., Foley, B., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Mellors, J., Wolinsky, S. & Korber, B., eds), pp. 80–174, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
31. Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W.-Y., Kojima, E., Alcaide, M. L. *et al.* (1995). Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 2398–2402.
32. Iversen, A. K. N., Shafer, R. W., Wehrly, K., Winters, M. A., Mullins, J. I., Chesebro, B. & Merigan, T. C. (1996). Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J. Virol.* **70**, 1086–1090.
33. Lacey, S. F. & Larder, B. A. (1994). Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1428–1432.
34. Kleim, J.-P., Rösner, M., Winkler, I., Paessens, A., Kirsch, R., Hsiou, Y. *et al.* (1996). Selective pressure of a quinoxaline nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on HIV-1 replication results in the emergence of nucleoside RT-inhibitor-specific (RT Leu-74→Val or Ile and Val-75→Leu or Ile) HIV-1 mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 34–38.
35. Selmi, B., Boretto, J., Navarro, J.-M., Sire, J., Longhi, S., Guerreiro, C. *et al.* (2001). The valine-to-threonine 75 substitution in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its relation with stavudine resistance. *J. Biol. Chem.* **276**, 13965–13974.
36. Wilson, J. E., Aulabaugh, A., Caligan, B., McPherson, S., Wakefield, J. K., Jablonski, S. *et al.* (1996). Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase: contribution of Met-184 to binding of nucleoside 5'-triphosphate. *J. Biol. Chem.* **271**, 13656–13662.
37. Kati, W. M., Johnson, K. A., Jerva, L. F. & Anderson, K. S. (1992). Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **267**, 25988–25997.
38. Feng, J. Y. & Anderson, K. S. (1999). Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **38**, 9440–9448.
39. Wöhr, B., Krebs, R., Goody, R. S. & Restle, T. (1999). Refined model for primer/template binding by HIV-1 reverse transcriptase: pre-steady-state kinetic analyses of primer/template binding and nucleotide incorporation events distinguish between different binding modes depending on the nature of the nucleic acid substrate. *J. Mol. Biol.* **292**, 333–344.
40. Marchand, B. & Götte, M. (2004). Impact of the translocational equilibrium of HIV-1 reverse transcriptase on the efficiency of mismatch extensions and the excision of mispaired nucleotides. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1823–1835.
41. Bebenek, K. & Kunkel, T. A. (1995). Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods Enzymol.* **262**, 217–232.

42. Eckert, K. A. & Kunkel, T. A. (1993). Fidelity of DNA synthesis catalyzed by human DNA polymerase α and HIV-1 reverse transcriptase: effect of reaction pH. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5212–5220.
43. Mendieta, J., Cases-González, C. E., Matamoros, T., Ramírez, G. & Menéndez-Arias, L. (2007). A Mg^{2+} -induced conformational switch rendering a competent DNA polymerase catalytic complex. *Proteins*, doi:10.1002/prot.21711.
44. Matamoros, T., Franco, S., Vázquez-Álvarez, B. M., Mas, A., Martínez, M. A. & Menéndez-Arias, L. (2004). Molecular determinants of multi-nucleoside analogue resistance in HIV-1 reverse transcriptases containing a dipeptide insertion in the fingers subdomain: effect of mutations D67N and T215Y on removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA primers. *J. Biol. Chem.* **279**, 24569–24577.
45. Cases-González, C. E., Franco, S., Martínez, M. A. & Menéndez-Arias, L. (2007). Mutational patterns associated with the 69 insertion complex in multi-drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase that confer increased excision activity and high-level resistance to zidovudine. *J. Mol. Biol.* **365**, 298–309.
46. Menéndez-Arias, L., Matamoros, T. & Cases-González, C. E. (2006). Insertions and deletions in HIV-1 reverse transcriptase: consequences for drug resistance and viral fitness. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 1811–1825.
47. Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr, Jacobo-Molina, A. *et al.* (1998). Structural and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 1095–1111.
48. Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Jr, Ding, J., Whitcomb, J. M. *et al.* (2001). Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J.* **20**, 1449–1461.
49. Peletskaya, E. N., Kogon, A. A., Tuske, S., Arnold, E. & Hughes, S. H. (2004). Nonnucleoside inhibitor binding affects the interactions of the fingers subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with DNA. *J. Virol.* **78**, 3387–3397.
50. Weiss, K. K., Chen, R., Skasko, M., Reynolds, H. M., Lee, K., Bambara, R. A. *et al.* (2004). A role for dNTP binding of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in viral mutagenesis. *Biochemistry*, **43**, 4490–4500.
51. Maeda, Y., Venzon, D. J. & Mitsuya, H. (1999). Altered drug sensitivity, fitness, and evolution of human immunodeficiency virus type 1 with *pol* gene mutations conferring multi-dideoxynucleoside resistance. *J. Infect. Dis.* **177**, 1207–1213.
52. Boyer, P. L., Gao, H.-Q. & Hughes, S. H. (1998). A mutation at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase interacts with mutations at positions 74 and 75 via the template primer. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 447–452.
53. Quiñones-Mateu, M. E., Soriano, V., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (1997). Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate. *Virology*, **236**, 364–373.
54. Matamoros, T., Deval, J., Guerreiro, C., Mulard, L., Canard, B. & Menéndez-Arias, L. (2005). Suppression of multidrug-resistant HIV-1 reverse transcriptase primer unblocking activity by α -phosphate-modified thymidine analogues. *J. Mol. Biol.* **349**, 451–463.
55. Menéndez-Arias, L. (1998). Studies on the effects of truncating α -helix E' of p66 human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on template-primer binding and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry*, **37**, 16636–16644.
56. Mas, A., Parera, M., Briones, C., Soriano, V., Martínez, M. A., Domingo, E. & Menéndez-Arias, L. (2000). Role of a dipeptide insertion between codons 69 and 70 of HIV-1 reverse transcriptase in the mechanism of AZT resistance. *EMBO J.* **19**, 5752–5761.
57. Boretto, J., Longhi, S., Navarro, J.-M., Selmi, B., Sire, J. & Canard, B. (2001). An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Anal. Biochem.* **292**, 139–147.
58. Boosalis, M. S., Petruska, J. & Goodman, M. F. (1987). DNA polymerase insertion fidelity—gel assay for site-specific kinetics. *J. Biol. Chem.* **262**, 14689–14696.
59. Mendelman, L. V., Boosalis, M. S., Petruska, J. & Goodman, M. F. (1989). Nearest neighbor influences on DNA polymerase insertion fidelity. *J. Biol. Chem.* **264**, 14415–14423.
60. Cases-González, C. E. & Menéndez-Arias, L. (2005). Nucleotide specificity of HIV-1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Ala-114. *Biochem. J.* **387**, 221–229.
61. Zinnen, S., Hsieh, J. C. & Modrich, P. (1994). Misincorporation and mispaired primer extension by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24195–24202.

